

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ANIELI CRISTINA MARASCHI**

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS OSMORREGULATÓRIOS DE  
ESPÉCIES EURIHALINAS SUBMETIDAS À VARIAÇÃO DE  
SALINIDADE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Fisiologia, do Curso de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup> Viviane Prodocimo

**CURITIBA  
2014**



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia




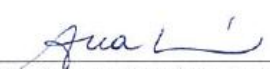
## PARECER

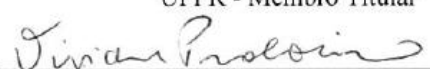
Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **ANIELI CRISTINA MARASCHI** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à APROVAÇÃO da acadêmica.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 26 de fevereiro de 2014.

  
\_\_\_\_\_  
**Professora Doutora Marta Marques de Souza**  
FURG- Membro Titular

  
\_\_\_\_\_  
**Professora Doutora Ana Lúcia Tararhuch**  
UFPR - Membro Titular

  
\_\_\_\_\_  
**Professora Doutora Viviane Prodocimo**  
UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

## **AGRADECIMENTOS**

Eu agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Viviane Prodocimo pela oportunidade. Além de cumprir o seu papel de orientadora, se tornou uma grande amiga. Agradeço pela paciência e ensinamentos, em sentar comigo na bancada e me mostrar como fazer coisas simples, quando eu não sabia ajustar uma pipeta. Por me permitir conhecer e me apaixonar pela fisiologia, especificamente pela osmorregulação. Obrigada por acreditar em mim e me dar a oportunidade de ser, em algum momento, a sua melhor estagiária.

À Profa. Dra. Carolina Arruda Freire pela co-orientação em todos os projetos e momentos. Por ser, juntamente com a Profa. Viviane, um modelo e referência na minha formação como pesquisadora.

Aos colegas do LFCO. Silvia, Giovanna, Juliane, Luciana, Natascha e Marcos, pela amizade dentro e fora do laboratório, compartilhando comigo momentos de felicidade, dúvidas e conquistas.

À Ju pela paciência e companheirismo. Pelo apoio e confiança, durante o mestrado e no novo caminho a trilhar.

À minha mãe e ao meu pai, por terem investido e acreditado em mim. À minha mãe, obrigada por me incentivar a estudar e nunca desistir.

Aos meus avós, Neiva e Celso, por sempre apoiar as minhas escolhas e me amparar.

À minha cachorra Foca, companheira inseparável que esteve ao meu lado até nas intermináveis noites de estudo e de escrita da dissertação.

Ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia, incluindo professores, colegas, técnicos e secretário, pela formação, oportunidade, ensinamentos, cordialidade e dedicação.

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes e a Profa. Dra. Marta Margarete Cestari por me conceder o espaço dos seus laboratórios para o desenvolvimento do meu projeto.

Ao Prof. Dr. Edvaldo Trindade pela atenção dada as minhas dúvidas e oferecer a possibilidade de utilização do Scanner de Lâminas.

Aos técnicos responsáveis pelo scanner de lâminas, Israel e Alessandra, pela cordialidade e atenção, e também pelo cuidado e competência em triar meu material.

À CAPES pela bolsa e pela oportunidade de realizar meu trabalho com extrema e exclusiva dedicação.

À todos os meus amigos que de alguma forma colaboraram, seja com uma palavra ou um momento de descontração, para que esse trabalho fosse realizado da melhor forma possível!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	VII
RESUMO GERAL.....	IX
ABSTRACT.....	X
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVOS.....	6

CAPÍTULO 1: RESPOSTAS OSMORREGULATÓRIAS NOS TELEÓSTEOS DULCÍCOLA ( <i>Rhamdia quelen</i> ) E MARINHO-ESTUARINO ( <i>Centropomus parallelus</i> ) SUBMETIDOS A CHOQUE OSMÓTICO.....	7
--	---

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. OSMORREGULAÇÃO EM PEIXES TELEÓSTEOS.....	8
1.2. ESPÉCIES ESTUDADAS.....	13
1.2.1. <i>Rhamdia quelen</i> .....	13
1.2.2. <i>Centropomus parallelus</i> .....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1. COLETA DAS ESPÉCIES E PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	15
2.2. DOSAGENS PLASMÁTICAS.....	16
2.3. ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	16
2.3.1. $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e $\text{H}^+$ -ATPase.....	16
2.3.2. ANIDRASE CARBÔNICA.....	17
2.4. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING.....	18
2.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	19
2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
3. RESULTADOS.....	21
3.1. OSMOLALIDADE E ÍONS.....	21
3.2. ATIVIDADE DA $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, $\text{H}^+$ -ATPase E ANIDRASE CARBÔNICA.....	21
3.3. EXPRESSÃO DA ENZIMA ANIDRASE CARBÔNICA.....	22
3.4. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA HSP70.....	23
3.4.1. <i>C. parallelus</i> .....	23
3.4.2. <i>R. quelen</i> .....	24
3.5. EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	25

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	30
4.1.OSMORREGULAÇÃO EM <i>Rhamdia quelen</i> .....	30
4.2.OSMORREGULAÇÃO EM <i>Centropomus parallelus</i> .....	36
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS OSMORREGULATÓRIAS BRANQUIAIS DO CAMARÃO DULCÍCOLA <i>Macrobrachium acanthurus</i> (CRUSTACEA: DECAPODA: PALAEMONIDAE) EXPOSTO A CHOQUE HIPER-OSMÓTICO.....	48
1. INTRODUÇÃO.....	49
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.1. COLETA DA ESPÉCIE E PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	53
2.2. ATIVIDADE DA Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase e H <sup>+</sup> -ATPase.....	53
2.3. IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	54
2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
3. RESULTADOS.....	56
3.1. ATIVIDADE DA Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase e H <sup>+</sup> -ATPase.....	56
3.2. ABUNDÂNCIA RELATIVA E LOCALIZAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	57
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	60
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
CONCLUSÕES GERAIS.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1 – Modelo hipotético das MRCs em teleósteos dulcícolas.....	10
Figura 2 – Modelo hipotético das MRCs em teleósteos marinhos.....	11
Figura 3 – Exemplar de <i>Rhamdia quelen</i> .....	14
Figura 4 – Exemplar de <i>Centropomus parallelus</i> .....	15
Figura 5 – Expressão enzima intracelular Anidrase Carbônica branquial em <i>R. quelen</i> .....	23
Figura 6 – Expressão de HSP70 em músculo de <i>C. parallelus</i> .....	23
Figura 7 – Expressão de HSp70 em brânquias de <i>R. quelen</i> .....	24
Figura 8 – Intensidade de fluorescência de $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, $\text{H}^+$ -ATPase e Anidrase Carbônica branquial de <i>R. quelen</i> .....	25
Figura 9 – Imunofluorescência da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em brânquia de <i>R. quelen</i> .....	26
Figura 10 – Imunofluorescência da $\text{H}^+$ -ATPase em brânquia de <i>R. quelen</i> .....	27
Figura 11 – Imunofluorescência da Anidrase Carbônica em brânquia de <i>R. quelen</i> .....	28
Figura 12 – Intensidade de fluorescência de $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ e Anidrase Carbônica branquial de <i>C. parallelus</i> .....	28
Figura 13 – Imunofluorescência da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e Anidrase Carbônica em brânquia de <i>C. parallelus</i> em água do mar e em água doce.....	29
Figura 14 – Imunofluorescência do cotransportador $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ em brânquia de <i>C. parallelus</i> .....	29
Tabela 1 – Osmolalidade e concentração iônica plasmática de <i>R. quelen</i> .....	21
Tabela 2 – Atividade enzimática branquial e renal de <i>R. quelen</i> .....	22

### CAPÍTULO 2

Figura 1 – Modelo dos transportadores iônicos em ionócitos nas brânquias de palemonídeos.....	52
---	----

Figura 2 – Exemplar de <i>Macrobrachium acanthurus</i> .....	52
Figura 3 – Atividade da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e $\text{H}^+$ -ATPase branquial de <i>M. acanthurus</i> .....	56
Figura 4 – Intensidade de fluorescência de $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, $\text{H}^+$ -ATPase e Anidrase Carbônica branquial de <i>M. acanthurus</i> .....	57
Figura 5 – Imunofluorescência da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase branquial em <i>M. acanthurus</i> .....	58
Figura 6 – Imunofluorescência da $\text{H}^+$ -ATPase branquial em <i>M. acanthurus</i> .....	58
Figura 7 – Imunofluorescência da Anidrase Carbônica branquial em <i>M. acanthurus</i> .....	59



## RESUMO GERAL

A habilidade dos organismos em lidar com os desafios osmóticos impostos pelo ambiente requer respostas a nível celular e sistêmico, incluindo transporte ativo transepitelial de íons por transportadores iônicos branquiais, para garantia do equilíbrio hidroeletrolítico do meio externo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade, expressão e localização dos transportadores iônicos  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase,  $\text{H}^+$ -ATPase,  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  e da enzima intracelular anidrase carbônica nas espécies de teleósteos dulcícola *Rhamdia quelen* e marinha-estuarina *Centropomus parallelus*, e do camarão dulcícola *Macrobrachium acanthurus*, frente à variação de salinidade. *R. quelen* foi exposta à salinidade 15 por 6 horas e à água doce (controle) para avaliação da osmolalidade e concentração dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$  plasmáticos; expressão da proteína HSP70 branquial; atividade branquial e renal, expressão e localização branquial da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (NKA) e  $\text{H}^+$ -ATPase e da enzima intracelular anidrase carbônica. Houve aumento apenas da expressão da NKA e da enzima anidrase carbônica nos animais expostos a 15‰ quando comparados ao controle, demonstrando o papel fundamental dessas proteínas na resposta ao choque hiper-osmótico. *C. parallelus* foi exposta à água doce por 10 dias e em água do mar (controle) para então avaliar a expressão de proteínas HSP70 muscular; expressão e localização branquial da NKA, do cotransportador NKCC e da anidrase carbônica. Não houve alteração nos parâmetros avaliados em *C. parallelus*. A localização da NKA, da  $\text{H}^+$ -ATPase em *R. quelen* e NKA e NKCC em *C. parallelus* foi mais evidente nas células da região interlamelar branquial, enquanto que a anidrase carbônica se apresentou marcada por todo o tecido de forma difusa. Em *M. acanthurus* expostos à salinidade 25‰ por 24 horas e mantido em água doce (controle) foram avaliadas a atividade, expressão e localização branquial da NKA e  $\text{H}^+$ -ATPase; a expressão e localização da anidrase carbônica branquial. Essa espécie não apresentou alteração na atividade e expressão das enzimas avaliadas. A NKA foi localizada nas células do septo, enquanto que a  $\text{H}^+$ -ATPase foi abundante nas células pilares das brânquias. A anidrase carbônica, na mesma forma que nos teleósteos, foi localizada em todo o tecido, no entanto, uma maior marcação nas células pilares foi observada. Os resultados de localização, atividade e expressão dos transportadores iônicos confirmam os modelos hipotéticos de transporte iônico transepitelial e sugerem que o grau de eurihalinidade apresentado pelas três espécies pode estar associado à ativação de outros mecanismos de ajuste osmo-iônico do extracelular e não só ao conjunto de transportadores iônicos avaliados.

## ABSTRACT

The ability of organisms to deal with osmotic challenges posed by the environment requires responses at the cellular and systemic level. This includes transepithelial active transport of ions by ion transporters gill to guarantee hydroelectrolyte the external environment. The aim of this study was to evaluate the activity, expression and localization of ion transporters  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (NKA),  $\text{H}^+$ -ATPase,  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  (NKCC) and intracellular enzyme carbonic anhydrase in freshwater teleost *Rhamdia quelen* and marine-estuarine teleost *Centropomus parallelus*, and freshwater shrimp *Macrobrachium acanthurus* to the variation of salinity. *R. quelen* was exposed to salinity 15 for 6 hours and freshwater (control) to review the plasma osmolality and concentrations of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  and  $\text{K}^+$ ; gill expression HSP70; gill and kidney activity, expression and location NKA,  $\text{H}^+$ -ATPase and carbonic anhydrase. There was only increased expression of NKA and carbonic anhydrase enzyme in animals exposed to 15‰ compared to control demonstrating the essential role of these proteins in response to hyper-osmotic shock. *C. parallelus* was exposed to freshwater for 10 days and seawater control and evaluated the expression of muscle protein HSP70; gill expression and location NKA, NKCC and carbonic anhydrase. There was no change in the parameters evaluated in *C. parallelus*. The location of the NKA,  $\text{H}^+$ -ATPase in *R. quelen* and location of the NKA and NKCC in *C. parallelus* were more evident in the cells of gill interlayer region, while the carbonic anhydrase presented marked throughout the tissue diffusely. The expression and localization in gills of the carbonic anhydrase in *M. acanthurus* exposed to 25‰ salinity for 24 hours and kept in freshwater (control) activity, expression and localization of gill NKA and  $\text{H}^+$ -ATPase were evaluated. This species showed no alteration in the activity and expression of those enzymes. The NKA was localized in the cells of the septum, while the  $\text{H}^+$ -ATPase was abundant in the pillar cells. Carbonic anhydrase in the same manner as in teleosts as located throughout the tissue, however, greater labeling was observed in the pillar cells. The results of location, activity and expression of ion transporters confirm the hypothetical models of transepithelial ion transport and suggest that the degree of eurihalinidade presented by the three species may be associated with activation of other mechanisms of osmo-ionic adjustment extracellular and not only the whole ion transporters evaluated.

## INTRODUÇÃO GERAL

Os organismos aquáticos, sejam marinhos ou dulcícolas, se inter-relacionam com fatores bióticos ou abióticos e tal interação poderá ser determinante do processo de invasão e ocupação de um habitat (Willmer *et al.* 2005; Begon *et al.* 2007). A água sustenta e ao mesmo tempo limita a condição à vida, logo seu ganho ou perda representa um desafio aos organismos. A concentração iônica do meio externo determina a intensidade e a direção de fluxo dos íons e da água que ocorre através dos epitélios de interface dos organismos, portanto, a homeostase hidroeletrolítica é um dos fatores fisiológicos determinantes do potencial de diversificação de nichos. Para tanto, os organismos requerem sistemas eficientes para lidar com perdas ou ganhos, de maneira obrigatória ou controlada, de água e solutos (Péqueux 1995; Schmidt-Nielsen 2002; Willmer *et al.* 2005).

Em ambiente marinho, a abundância de sal dissolvido resulta na saída passiva de água corporal e influxo iônico. Em ambiente dulcícola, a escassez iônica reflete a entrada passiva de água e efluxo iônico. Os desafios fisiológicos podem ainda ser acentuados quando se trata de um habitat instável, em que a concentração iônica do meio e outros fatores variam diariamente, como em regiões entre-marés e estuários (Péqueux 1995; Marshall e Grosell 2005).

O controle homeostático diante dos desafios osmóticos se dá por meio de diferentes ajustes osmorregulatórios, como a redução ou aumento da permeabilidade dos epitélios de troca. Quando existe alta permeabilidade dos epitélios, o fluido extracelular torna-se isosmótico em relação ao ambiente. Os organismos que exibem essa estratégia são classificados como *Osmoconformadores* e cabe às células individuais desses organismos exibirem um mecanismo próprio de regulação de volume para controle e manutenção das suas funções vitais frente às alterações do fluido extracelular, chamada *Regulação Isosmótica Intracelular (IIR)* (Florkin 1962; Péqueux 1995; Freire *et al.* 2008b; Foster *et al.* 2010). A diminuição da permeabilidade dos epitélios de troca reflete em uma manutenção da concentração do fluido extracelular mais ou menos constante, de maneira independente da concentração do ambiente. Esses organismos são chamados de *Osmorreguladores* e realizam *Regulação Anisosmótica Extracelular (AER)* (Péqueux 1995; Marshall e Grosell 2005; Freire *et al.* 2008a). Para regular a composição do fluido extracelular independente da do ambiente, os organismos podem realizar o processo de *hiper-regulação* (mantendo suas concentrações extracelulares acima da concentração do ambiente) ou *hipo-regulação* (mantendo suas

concentrações extracelulares abaixo da concentração do ambiente) (Florkin 1962; Péqueux 1995; Marshall and Grosell 2005; Freire *et al.* 2008a; Foster *et al.* 2010).

As espécies apresentam intervalos de condições ambientais nas quais são melhores adaptadas, ou seja, uma faixa ótima na qual desempenham de maneira eficaz suas propriedades fisiológicas e ecológicas (Begon *et al.* 2007). Quando relacionados aos limites fisiológicos de tolerância a diferentes concentrações osmóticas do meio, os organismos podem ser *estenohalinos*, quando apresentam estreita faixa de tolerância, ou *eurihalinos*, quando apresentam ampla faixa de tolerância (Péqueux 1995; Marshall e Grosell 2005). Neste caso, teleósteos ou crustáceos eurihalinos, que enfrentam flutuações de salinidade do habitat natural, sejam elas causadas por variações das condições ambientais ou necessidade de migração e ciclo de vida, mantendo as concentrações do extracelular acima ou abaixo da concentração do meio externo, podem se apresentar como *hiper- e/ou hipo-reguladores* (Péqueux 1995; Marshall e Grosell 2005).

O epitélio das brânquias é a interface entre o fluido extracelular e o ambiente, sendo a brânquia considerada o principal órgão de troca e, em alguns casos, junto aos órgãos excretores e ao trato gastrointestinal, participa simultaneamente de diferentes processos, como respiração, íono/osmorregulação, equilíbrio ácido-base e excreção de nitrogênio (Evans *et al.* 2005; Freire *et al.* 2008a). A estrutura branquial, sua composição e tipo celular (Evans *et al.* 2005; Freire *et al.* 2008a), as vias de transporte transcelular (Péqueux 1995; Evans *et al.* 2005; Marshall e Grosell 2005; Freire *et al.* 2008a; McNamara e Faria 2012) e/ou paracelular (Chasiotis *et al.* 2012) variam amplamente entre as diferentes espécies e podem ser correlacionadas ao sucesso de ocupação de diferentes habitats (Evans *et al.* 2005; Chasiotis *et al.* 2012).

A capacidade osmorregulatória não decorre apenas de diferenças no grau de permeabilidade, mas também na atividade e expressão de um conjunto de transportadores de membrana presentes nas células do epitélio branquial, denominadas ionócitos, que apresentam elevado número de mitocôndrias (Evans *et al.* 2005; Hwang e Lee 2007; Freire *et al.* 2008a; McNamara e Faria 2012). O estudo desses transportadores de membrana é fundamental quando se trata do transporte iônico transepitelial.

O estudo do transporte de íons em tipos celulares específicos e aspectos funcionais de proteínas transportadoras como a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA), em resposta aos desafios osmóticos, lideram as pesquisas osmorregulatórias. A NKA está presente nas membranas basais das células branquiais, sendo responsável pelo estabelecimento de gradientes

eletroquímicos através das membranas de modo geral (Péqueux 1995; Marshall e Grosell 2005; Evans *et al.* 2005; Freire *et al.* 2008a; Sáez *et al.* 2009; McNamara e Faria 2012; Havird *et al.* 2013). A NKA é responsável pelo bombeamento de três íons  $\text{Na}^+$  do intracelular para o extracelular, através da membrana basal, em troca de dois íons  $\text{K}^+$  vindos do fluido extracelular para o intracelular. O gradiente eletroquímico de  $\text{Na}^+$  gerado pela NKA direciona e favorece outros tipos de transporte, como por exemplo, a entrada de  $\text{Na}^+$  e particularmente  $\text{Cl}^-$  através do cotransportador  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  (NKCC), também basolateral na brânquia de teleósteos marinhos (Péqueux 1995; Evans *et al.* 2005; Marshall e Grosell 2005; Freire *et al.* 2008a; McNamara e Faria 2012).

Devido a tais características, a atividade enzimática, a expressão e a localização das isoformas de NKA têm contribuído com estudos em grupos diversos, constatando-se alteração na expressão gênica e proteica, e na atividade enzimática da proteína em resposta a alterações em salinidade e de ajuste ao meio diluído ou hipersalino no grupo dos peixes (Hiroi e McCormick 2007; Yang *et al.* 2011; Harvird *et al.* 2013) e em camarões palemonídeos (Lima *et al.* 1997; revisado em Lucu e Towle 2003; Santos *et al.* 2007; Belli *et al.* 2009; Faleiros *et al.* 2010; Boudour-Bouchecker *et al.* 2013; França *et al.* 2013; Havird *et al.* 2013). Tanto para os peixes quanto para crustáceos, o papel da NKA no transporte de  $\text{NaCl}$ , nos processos de absorção ou secreção, é bem definido.

O cotransportador eletroneutro NKCC também está presente nas membranas de uma grande variedade de células epiteliais que participam do transporte de sal, e ainda em células não epiteliais, nas quais participa da regulação de volume celular (Péqueux 1995; Russell 2000; Hoffmann *et al.* 2007; Prodocimo e Freire 2006; Freire *et al.* 2013). O NKCC é um dos membros da família dos cotransportadores de  $\text{Cl}^-$  acoplado a cátions (CCC, cation-coupled  $\text{Cl}^-$  cotransport) (Russell 2000). No que se refere às diferentes isoformas do NKCC e o seu papel no transporte de sal em mamíferos, a isoforma NKCC1 é encontrada na membrana basal de epitélios secretores, e assim é devidamente chamada de isoforma secretora. A isoforma NKCC2 é conhecida por residir na membrana apical das células de tecido epitelial renal e é caracterizada por ser uma isoforma de absorção (Russell 2000; Hass e Forbush 2000).

Outras proteínas que participam dos mecanismos osmorregulatórios, como a  $\text{H}^+$ -ATPase (HA) e a enzima citosólica Anidrase Carbônica, apresentam função demonstrada por estar associada aos mecanismos de absorção de sal (Marshall e Grosell 2005; Kirshner 2004; Freire *et al.* 2008a; Huang *et al.* 2010; Evans 2011; McNamara e Faria 2012). A  $\text{H}^+$ -ATPase, também chamada de V-ATPase, é responsável pelo transporte ativo de íons  $\text{H}^+$  para fora das

células epiteliais, esse transporte através das membranas dos epitélios promove um gradiente que favorece o transporte mediado por outros transportadores, transporte este com relevância principalmente em peixes e crustáceos de água doce (Forgac 1999; Perry *et al.* 2003; Marshall e Grosell 2005). A HA participa da acidificação do citoplasma de algumas organelas (Forgac 1999), e também atua significativamente no mecanismo de regulação ácido-base (Perry *et al.* 2000; Duarte *et al.* 2013).

A atividade da anidrase carbônica branquial é responsável pela catalisação da reação reversível de hidratação do  $\text{CO}_2$ , resultando em íons hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) e íons bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) (Perry e Gilmour 2006; revisado em Lionetto *et al.* 2012). Os íons  $\text{H}^+$  liberados na reação tornam-se substratos disponíveis para a atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase e então, absorção de sal em ambientes diluídos (Kirschner 2004). Apesar de bem conhecida sua participação nesse mecanismo (Hirose *et al.* 2003; Perry *et al.* 2003; Marshall e Grosell 2005; Gilmour e Perry 2009), a enzima também tem grande importância na tolerância a hipersalinidade (Souza-Bastos e Freire 2009; Sattin *et al.* 2010). A enzima intracelular tem papel fundamental nos mecanismos de excreção de  $\text{CO}_2$  e regulação do equilíbrio ácido-base (Henry e Swenson 2000; Claiborne *et al.* 2002; Gilmour e Perry 2009; revisado em Lionetto *et al.* 2012).

Falhas osmorregulatórias podem acarretar em alterações osmo-iônicas no extracelular, exigindo rápidas respostas das células, como controle e regulação do volume celular (IIR) (Florkin 1962). Caso não sejam compensadas tais alterações, danos à célula podem ser desencadeados, como por exemplo, a desnaturação de proteínas. Como consequência, as células podem responder com um aumento da síntese de chaperonas moleculares, um grupo de proteínas altamente conservado entre as espécies, responsáveis por evitar danos irreversíveis às células (Feder e Hofmann 1999). Essas proteínas são chamadas de proteínas de choque térmico (HSP, do inglês Heat Shock Protein), também denominadas proteínas de estresse (Ackerman *et al.* 2000; Hofmann 2005). Dentre as HSPs, destacam-se as proteínas da família das HSP70, com peso molecular de 70kDa, que atuam na manutenção da viabilidade celular, impedindo a desnaturação ou agregação de proteínas citoplasmáticas, além das proteínas nucleares, prevenindo prejuízos ao funcionamento da célula e possíveis danos genéticos (Mayer e Bukau 2005; Hofmann 2005).

As HSP70 apresentam resposta rápida e significativa a diferentes tipos de estressores, particularmente os que podem desnaturar proteínas (Jonsson *et al.* 2006; Yamashita *et al.* 2010). Como por exemplo, a resposta ao choque térmico (Hoffmann 2005; Tomanek 2008; Colson-Proch *et al.* 2010), ao choque hiper- ou hipo-osmótico (Deane *et al.*

2002; Niu *et al.* 2008; Sen *et al.* 2009; Guiterre *et al.* 2013) e a condições de hipóxia (Delaney e Klesius 2004). Também é utilizada como biomarcador a diferentes tipos de contaminantes (Timofeev *et al.* 2006; Rhee *et al.* 2008; Webb e Gagnon 2008) e indicador de estado de estresse (Basu *et al.* 2002; Iwama *et al.* 2003). No entanto, a expressão gênica e proteica das proteínas de estresse pode diferir entre espécies e entre tecidos, podendo ser dependente do tipo de estressor e ainda, da família das proteínas que se está avaliando (Iwama *et al.* 2003).

Quando se avaliam respostas a nível celular ou sistêmico, a modulação de proteínas transportadoras, como NKA, NKCC, H<sup>+</sup>-ATPase e anidrase carbônica, assim como de proteínas relacionadas com a proteção ao estresse osmótico, como as HSP70, pode auxiliar na elucidação do funcionamento dos mecanismos de absorção e secreção iônica, na água doce e na água do mar, respectivamente. Além disso, a expressão e a localização desses transportadores no epitélio branquial confirmam seu papel fundamental nos processos de transição entre ambientes durante o processo evolutivo das espécies, ou ainda, no decorrer de ações migratórias a fins reprodutivos ou não, demonstrando quando e quais mecanismos osmorregulatórios são necessários e ativados frente aos diferentes graus de variação de salinidade do ambiente, em curto e em longo prazo (Péqueux 1995; Marshall e Grosell 2005; Evans 2005; Evans 2011).

Assim, pretendeu-se avaliar as respostas osmorregulatórias das espécies de peixes eurihalinas *Rhamdia quelen* e *Centropomus parallelus*, e do camarão dulcícola eurihalino *Macrobrachium acanthurus* submetidos à variação de salinidade, correlacionando a atividade, expressão e localização de transportadores iônicos de membrana e enzimas intracelulares envolvidas no transporte transcelular e na resposta ao choque osmótico. Esse conjunto de respostas fisiológicas associado à evolução em um habitat pode determinar o grau de eurialinidade e, conseqüentemente, o aumento do potencial de dispersão biogeográfica e invasão de novos ambientes.

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Avaliar as proteínas  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (NKA),  $\text{H}^+$ -ATPase,  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  e anidrase carbônica das espécies dulcícolas frente ao aumento de salinidade, *Rhamdia quelen* (peixe teleósteo) exposta à 15‰ durante 6 horas e *Macrobrachium acanthurus* (camarão palemonídeo) exposta à 25‰ durante 24 horas, e do peixe teleósteo marinho-estuarino *Centropomus parallelus* frente à redução gradual da salinidade da água do mar até a água doce durante 10 dias.

### Objetivos específicos

- Avaliar a contribuição da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (NKA),  $\text{H}^+$ -ATPase e da enzima intracelular Anidrase Carbônica branquiais nos processos osmorregulatórios frente ao choque hipo ou hiper-osmótico nas três espécies estudadas, e do cotransportador  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  (NKCC) branquial na espécie marinha-estuarina *C. parallelus*;
- Determinar a ativação de mecanismos celulares de proteção frente ao choque hiper- ou hipo-osmótico através da expressão de proteínas de estresse HSP70;
- Avaliar de forma comparativa as respostas fisiológicas entre as diferentes espécies nas diferentes condições experimentais e fazer correspondência entre a plasticidade fisiológica e a modulação das proteínas  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (NKA),  $\text{H}^+$ -ATPase,  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  (NKCC) e Anidrase Carbônica.



**Capítulo 1: Respostas osmorregulatórias nos teleósteos dulcícola  
(*Rhamdia quelen*) e marinho-estuarino (*Centropomus parallelus*)  
submetidos a choque osmótico**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. *Osmorregulação em peixes teleósteos:*

Todos os peixes teleósteos são osmorreguladores e mantêm suas concentrações osmótica e iônica independente da concentração do meio (em torno de um quarto a um terço da concentração da água do mar), sendo hiper-osmóticos quando em ambiente dulcícola ou hipo-osmóticos quando em ambiente marinho (Marshall e Grosell 2005; Evans *et al.* 2005). Algumas espécies são eurihalinas, podendo sobreviver em uma ampla faixa de salinidade, apresentando capacidade osmorregulatória variável. Pode-se considerar como exemplo de espécies eurihalinas, os representantes de estuários, região de entre marés e espécies com hábito migratório com ou sem fins reprodutivos (diádromos e anfídromos, respectivamente), além de espécies residentes de ambientes sem grandes flutuações de salinidade e que mesmo assim toleram condições acima ou abaixo das encontradas em seu ambiente natural (Marshall e Grosell 2005).

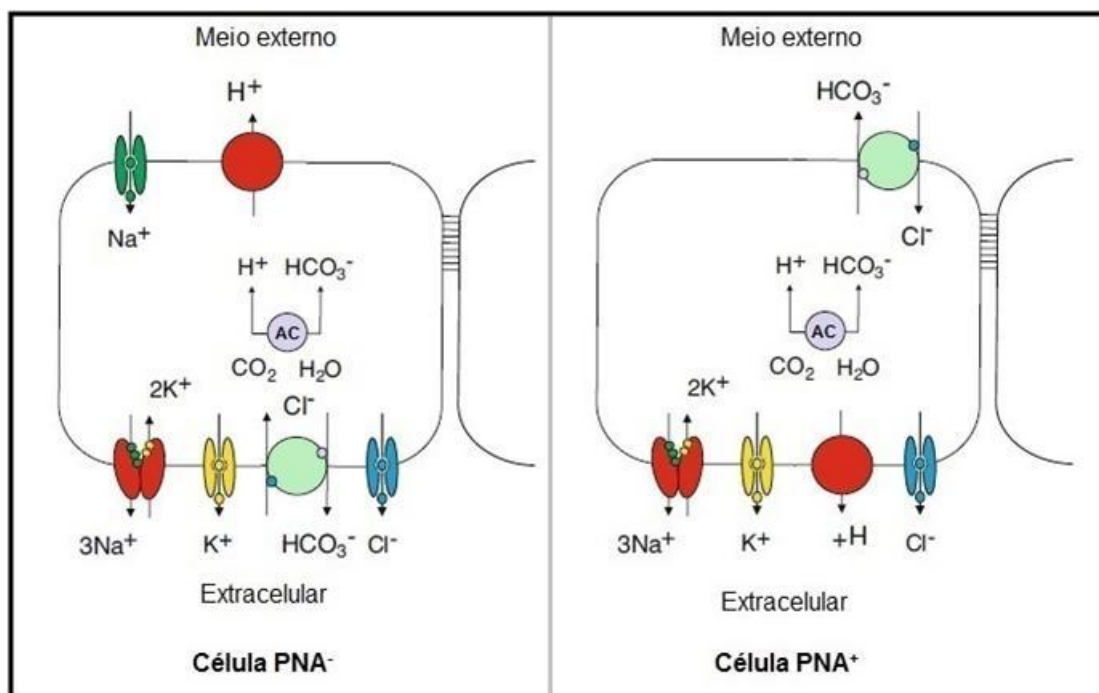
Para lidar com situações de abundância ou escassez de água e íons, os teleósteos habitantes de ambiente dulcícola ou marinho apresentam diferentes estratégias osmorregulatórias para manutenção da homeostase de água e íons do fluido extracelular. Em ambientes diluídos, a perda iônica favorecida por uma elevada razão entre a concentração plasmática e do meio (cerca de 200:1 para íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  no extracelular em relação ao meio externo) e o ganho de água passivo pelo epitélio branquial representam um desafio para as espécies desse ambiente (Evans 2011). Como mecanismo compensatório os teleósteos de água doce obtêm íons através da absorção ativa branquial, da alimentação, e também produzem, através dos rins, grandes volumes de urina diluída. O oposto é descrito para teleósteos marinhos, em que ocorre perda de água e ganho iônico de maneira passiva através do epitélio branquial. Estes ingerem água do mar, absorvendo o conteúdo de água e íons pelo intestino, e secretando ativamente íons pelas brânquias. Os rins dos teleósteos marinhos não conseguem concentrar a urina e produzem um pequeno volume de urina isotônica, a qual é rica em íons divalentes (Marshall e Grosell 2005; Evans 2008).

Para realizar absorção e secreção ativa de íons o epitélio branquial contém células especializadas, denominadas *células ricas em mitocôndria* (*Mitochondrion-rich cells - MRCs*). Existem diferentes caracterizações entre a forma e função das MRCs em teleósteos dulcícolas e teleósteos marinhos (Evans *et al.* 2005; Evans 2008; Evans 2011). A polaridade das células do epitélio permite identificar diferentes composições dos transportadores

inseridos entre as porções da membrana apical e basolateral (Marshall e Grosell 2005; Evans *et al.* 2005).

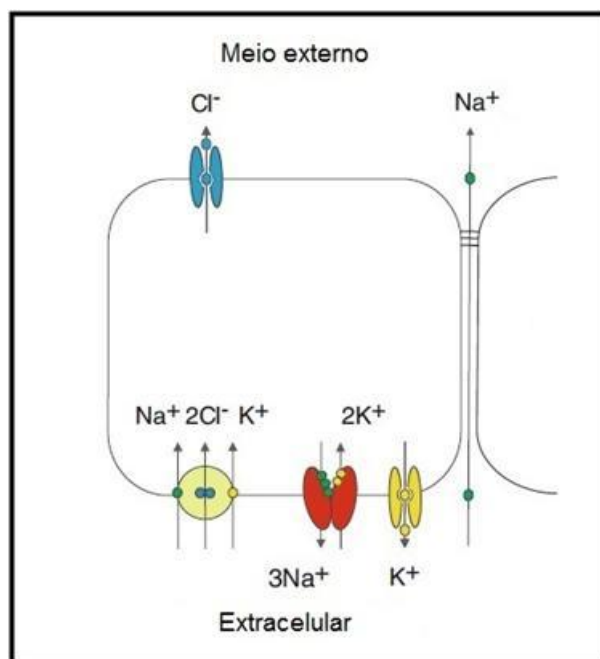
Em água doce o ganho de água ocorre primariamente por fluxo osmótico através do epitélio branquial, refletindo a necessidade de um influxo iônico ativo de NaCl para a manutenção da homeostase (Evans 2008). Esse mecanismo de entrada de Na<sup>+</sup> via apical pelas MRCs pode variar entre as espécies, podendo o influxo de Na<sup>+</sup> via canal ser favorecido pela atividade da H<sup>+</sup>-ATPase (HA) através da hiperpolarização da membrana; a entrada de Na<sup>+</sup> na célula pode ocorrer através do trocador eletroneutro Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE); ou ainda, via NKCC ou via cotransportador Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> (NCC) apical. Termodinamicamente a hipótese da hiperpolarização da membrana pela HA é a mais aceita (Fig. 1) (Evans 2011; Brix e Grosell 2011).

Diferentes tipos celulares branquiais foram encontrados e modelos de transporte foram propostos a partir do isolamento e caracterização de células (MRCs) da truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Galvez *et al.* 2002; revisado em Marshall e Grosell 2005; Evans 2008). A partir da marcação de MRCs de brânquias da truta arco-íris (Galvez *et al.* 2002) pela técnica de separação magnética das células e ligação por aglutinina de amendoim (peanut agglutinin – PNA) permitiu separá-las em subpopulações denominadas PNA<sup>-</sup> e PNA<sup>+</sup>. Quando as MRCs apresentam a H<sup>+</sup>-ATPase localizada na membrana apical ocorre secreção de ácido para ambiente externo associada à absorção apical de Na<sup>+</sup> via canal, e essas células são chamadas PNA<sup>-</sup> (Fig. 1). Se o trocador apical expresso for Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ocorre secreção de base concomitante à absorção de Cl<sup>-</sup>, e essas células são PNA<sup>+</sup> (Fig. 1). Em ambos os tipos celulares a Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase está presente no lado basolateral (Marshall e Grosell 2005; Evans 2011). A enzima responsável por catalisar a reação que disponibiliza íons H<sup>+</sup> e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> para posterior troca por Na<sup>+</sup> ou Cl<sup>-</sup> é a anidrase carbônica intracelular branquial expressa nas células de teleósteos marinhos e dulcícolas, porém, com papel relevante no mecanismo de absorção de sal (Kirschner 2004; Evans *et al.* 2005; Marshall e Grosell 2005; Perry e Gilmour 2006; Gilmour e Perry 2009).



**Figura 1.** Modelo hipotético da disposição dos transportadores iônicos nas células ricas em mitocôndria (MRCs) branquial de teleostes dulcícolas. À esquerda as células PNA<sup>-</sup> (absorvem Na<sup>+</sup> e secretam ácido) e à direita as células PNA<sup>+</sup> (absorvem Cl<sup>-</sup> e secretam base). A enzima intracelular anidrase carbônica está representada por AC. Modificado de McNamara e Faria 2012; baseado em Marshall e Grosell 2005.

Em água do mar o fluxo osmótico é revertido quando comparado ao fluxo em água doce, e a disposição dos transportadores na célula reflete a necessidade de secretar sal (Como ilustrado na Fig. 2). Esse mecanismo de secreção de sal requer a atividade integrada do intestino, rins e brânquias (Laverty e Skadhauge 2012). A secreção branquial de NaCl é mais compreendida do que o processo de absorção de sal pelas brânquias de teleostes dulcícolas. A Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) está localizada basolateralmente e é responsável pelo transporte dos íons Na<sup>+</sup> para o extracelular e K<sup>+</sup> para o intracelular. O gradiente eletroquímico de Na<sup>+</sup> gerado pela NKA é usado pelo cotransportador basolateral Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,2Cl<sup>-</sup> (NKCC) para o influxo celular de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e 2Cl<sup>-</sup>. O influxo de Cl<sup>-</sup> acarreta em um desequilíbrio eletroquímico para o íon e a extrusão de Cl<sup>-</sup> se dá através de canais apicais para íons cloreto, homólogos ao regulador de condutância transmembrana de fibrose cística (CFTR). O transporte de Cl<sup>-</sup> é acompanhado da saída de Na<sup>+</sup> via paracelular em junções fracas entre as MRCs e células acessórias. O K<sup>+</sup> que entra na célula via NKA é reciclado de volta para o extracelular por canais basolaterais (Marshall e Grosell 2005; Evans *et al.* 2005; Hwang e Lee 2007; Laverty e Skadhauge 2012) (Fig. 2).



**Figura 2.** Modelo hipotético da disposição dos transportadores iônicos nas células ricas em mitocôndria (MRCs) branquial de teleostes marinhos. Modificado de McNamara e Faria 2012; baseado em Marshall e Grosell 2005.

Quando os animais são transferidos para condições de salinidade que diferem do meio de origem (de um meio diluído para um meio concentrado ou vice-versa) ocorrem mudanças coordenadas nas taxas de ingestão de água, absorção intestinal de sal e água, formação da urina e transporte transepitelial branquial para garantir a homeostase hidroeletrolítica. Alterações na expressão, atividade e localização do conjunto de transportadores que constituem as MRCs detém informações relevantes para o entendimento desses mecanismos (Gonzalez 2012; Laverty e Skadhauge 2012).

A modulação da expressão e atividade desses transportadores, como a NKA branquial, pode representar um importante ajuste osmo-iônico em várias espécies (revisado em Evans *et al.* 2005; Hwang *et al.* 2011). A atividade e expressão desse transportador são salinidade e espécie dependentes e sua função é requerida na secreção e absorção de íons (Saéz *et al.* 2009). Teleósteos eurihalinos geralmente expressam baixos níveis de NKA branquial em salinidade similar ao do seu ambiente natural (Hwang e Lee 2007). Em peixes marinhos, foram constatados aumento da atividade e da expressão da NKA branquial em exposição à água doce (Lin *et al.* 2003; Kang *et al.* 2012; Tang e Lee 2013) e em salinidade acima da água do mar (Saoud *et al.* 2007). Em espécies de ambiente marinho-estuarino, encontraram maior expressão de RNAm de NKA branquial e renal quando expostas a diluição

da salinidade ou em água doce (Choi e An 2008). Uma maior atividade (Tang e Lee 2007; Yang *et al.* 2009) e expressão da NKA branquial (Yang *et al.* 2009) foi encontrada em espécies eurihalinas estuarinas quando expostos à água do mar. Na espécie eurihalina estuarina *Poecilia latipinna* aclimatada à água do mar, os níveis de expressão e atividade da NKA branquial foram diminuídos quando retornada para água doce (Yang *et al.* 2011).

O transportador NKCC, em peixes, se destaca nas pesquisas que avaliam diferentes padrões de expressão (Mackie *et al.* 2007; Tang e Lee 2007; Scott *et al.* 2008; Kang *et al.* 2010; Yang *et al.* 2011), imunolocalização (Prodocimo e Freire 2006; Yang *et al.* 2011) e regulação (Flemmer *et al.* 2010; Kahle *et al.* 2010) em resposta a salinidades diferentes. A expressão de RNAm para a isoforma NKCC1a branquial na enguia amarela europeia (Cutler e Cramb 2002), no robalo (Lorin-Nebel *et al.* 2006) e em salmão do Atlântico (Mackie *et al.* 2007) são maiores em água do mar comparado a peixes aclimatados à água doce. No salmão do Atlântico ocorre um aumento na expressão proteica do NKCC branquial após transferência para água do mar (Pelis *et al.* 2001; Tipsmark *et al.* 2002). O estudo comparativo da plasticidade fenotípica de duas espécies irmãs encontraram maiores níveis de expressão de RNAm do cotransportador NKCC1 em condições de água salgada tanto em análises no campo quanto em condições de laboratório (Berdan e Fuller 2012). Tais resultados indicam uma participação mais significativa do NKCC nos mecanismos de secreção de sal do que no de absorção de sal. Porém, há poucas informações do NKCC diante da exposição a diferentes salinidades quando comparado à NKA.

O papel da  $H^+$ -ATPase atribuído aos mecanismos osmorregulatórios é mais explorado quanto à sua localização celular durante a absorção de sal em meio diluído (Wilson *et al.* 2000; Katoh *et al.* 2002; Catches *et al.* 2006; Tresguerres *et al.* 2006; Ito *et al.* 2013). Outros estudos têm também associado a participação da expressão e atividade da  $H^+$ -ATPase em resposta a alteração de salinidade. Na espécie *Trichogaster microlepis* de regiões estuarinas, o aumento da atividade da  $H^+$ -ATPase só foi observado durante exposição à água destilada (Huang *et al.* 2009). Na análise comparativa entre duas espécies irmãs, a estenohalina *Lucania goodei* e a eurihalina *L. parva*, não houve diferença na expressão gênica de RNAm para  $H^+$ -ATPase em condições de água doce quando comparadas a condições de salinidade 10 e 20‰ (Berdan e Fuller 2012).

A enzima Anidrase Carbônica é funcionalmente importante na absorção de NaCl, apresentando aumento na atividade e expressão frente à exposição a água doce (Scott e Schulte 2005). Foi observado aumento na expressão gênica das isoformas CA2a e CA15a em

condições de água com baixa concentração de  $\text{Na}^+$  (0,03mM) quando comparado à exposição à concentração de 7 e 70 mM de  $\text{Na}^+$  no meio (Ito *et al.* 2013). No entanto, existem evidências em que não são encontradas diferenças na expressão da enzima entre diferentes populações ou diferentes salinidades (Tang e Lee 2007; Berdan e Fuller 2012). A participação da anidrase carbônica em condições de salinidades elevadas (Souza-Bastos e Freire 2009; Sattin *et al.* 2010) sugere a sua participação na tolerância aos ambientes hiper-osmóticos e correlação com equilíbrio ácido-base (Souza-Bastos e Freire 2009).

Desta forma o objetivo deste capítulo foi investigar as respostas celulares e subcelulares frente à alteração de salinidade das espécies de teleósteo dulcícola *Rhamdia quelen* e marinha-estuarina *Centropomus parallelus*, através da avaliação da expressão, atividade e localização de proteínas envolvidas nos processos osmorregulatórios, como a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e  $\text{H}^+$ -ATPase, o cotransportador  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  e a enzima Anidrase Carbônica, funcionalmente relevantes nos mecanismos de transporte de sal. Foi também objetivo avaliar as respostas celulares frente ao choque osmótico imposto através da análise da expressão de proteínas HSP70. Com isso, espera-se compreender se a modulação da atividade e expressão desse conjunto de proteínas está correlacionada com o grau de tolerância à variação de salinidade dessas espécies.

## **1.2. Espécies estudadas**

### **1.2.1. *Rhamdia quelen***

*Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard 1824) popularmente conhecido como jundiá é pertencente à ordem Siluriformes e apresenta distribuição do sudeste do México até a região sul da Argentina (Bockmann e Guazzelli 2003). A ordem Siluriformes tem origem primária em água doce (Caroll 1988) e atualmente apenas cerca de 117 espécies são consideradas marinhas (Nelson 2006). Embora a espécie seja de ambiente dulcícola, ela pode também ser encontrada ocasionalmente em regiões estuarinas com variação de salinidade entre 5‰ e 13‰ (Loebmann e Vieira 2006; Milani e Fontoura 2007; Vargas e Bessonart 2007; Vitule 2007).

Recentes evidências têm apontado que em condições experimentais a espécie tolera salinidades de até 25‰ durante uma hora, apesar de alterações fisiológicas indicarem desequilíbrio homeostático nessa salinidade (Souza-Bastos e Freire 2009). Em salinidade 15‰, durante exposição de 6 horas, a espécie demonstrou perda da capacidade de manutenção da hidratação tecidual junto ao aumento da expressão de proteínas HSP70

musculares, indicando uma correlação entre o aumento da síntese de HSP70 frente a uma diminuição do volume celular e conteúdo hídrico, garantindo a manutenção e integridade das proteínas do intracelular e, conseqüentemente, da célula (Gutierre *et al.* 2013).



**Figura 3.** Exemplar de *Rhamdia quelen* (Foto: Léo Nico)

#### 1.2.2. *Centropomus parallelus*

A espécie *Centropomus parallelus* (Poey 1860) (Centropomidae, Perciformes), popularmente conhecida por robalo peba na região sul e sudeste, é amplamente distribuída na chamada costa atlântico-americana, que vai desde a costa da Flórida (EUA) até o Litoral de Santa Catarina (Brasil) (Rivas 1986; Tringali *et al.* 1999).

*Centropomus parallelus* apresenta elevado grau de eurihalinidade, sendo abundante em águas salobras de ambientes estuarinos, além de também encontrada em águas marinhas e continentais, e ocasionalmente em lagoas hipersalinas (Cháves 1961). A espécie pode ser aclimatada em água 0‰ e 35‰ sem grandes prejuízos osmorregulatórios (Wosnick 2009). Indivíduos juvenis em desenvolvimento demonstraram o mesmo padrão de crescimento em diferentes condições de salinidade (0‰, 5‰, 15‰ e 35‰) (Tsuzuki *et al.* 2007). Além de bastante eurihalina, a espécie é também bastante resistente a variações nos parâmetros físico-químicos da água, apresentando alto potencial para aquicultura (Borba *et al.* 1996). O elevado grau de eurihalinidade o torna um excelente modelo para estudo de ativação dos mecanismos osmorregulatórios frente às mudanças de salinidade.





**Figura 4.** Exemplar de *Centropomus parallelus*. Foto: Uwe Krumme (www.fishbase.org)

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Coleta das espécies e protocolo experimental

Indivíduos da espécie *R. quelen* foram adquiridos na Piscicultura Peixes e Peixes, CEASA – PR, e então transportados em galões de 30 litros com aeração constante para o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação, no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Durante o período de aclimação, os animais foram mantidos em aquários de 250 litros contendo água doce filtrada, por 5 dias, sob aeração constante, temperatura de  $\sim 20^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo natural. Os animais foram alimentados diariamente com ração comercial.

Durante experimento os espécimes adultos ( $20,9 \pm 1,12$  cm) foram mantidos por 6 horas em aquários de 5 litros contendo um único indivíduo por aquário, constituindo o grupo controle em água doce ( $n=5$ ) e grupo experimental transferido diretamente do estoque para água 15‰ preparada a partir da diluição da água do mar (35‰) ( $n=5$ ). Após esse período os indivíduos foram anestesiados em benzocaína (80mg/L), medidos e as amostras de sangue foram coletadas, centrifugadas por 5 min ( $\sim 3000$  rpm, em temperatura ambiente) e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior mensuração da osmolalidade e dosagens iônicas plasmáticas. Os peixes foram descerebrados e então amostras de tecido foram retiradas. O segundo arco branquial direito foi dissecado para técnica de imunofluorescência e os demais arcos branquiais e os rins foram retirados e armazenados em  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior realização de ensaios enzimáticos e de expressão proteica.

Os espécimes de *Centropomus parallelus* foram adquiridos da piscicultura Júlio Pandini, ES, transportados via aérea até Curitiba e levados ao Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação, no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do

Paraná. Durante um período de aclimação de sete dias, os animais foram alimentados diariamente com ração comercial e mantidos em aquário estoque de água 35‰, aeração constante e temperatura de ~20°C.

Indivíduos juvenis ( $5,4 \pm 0,65$  cm) foram divididos em grupo controle, mantido em água 35‰, e grupo experimental, que foi submetido à diluição da água do mar (queda de 5‰ a cada 24 horas) até atingir salinidade de 0‰. Ambos os procedimentos foram realizados em aquários de 20 litros, totalizando 5 indivíduos por aquário, durante 10 dias. Para o grupo experimental, o período de 10 dias foi contado a partir da diluição total da água (alcançar salinidade 0‰). Após o experimento, os peixes foram anestesiados em benzocaína (80mg/L), não sendo possível fazer coleta de sangue devido ao tamanho reduzido dos exemplares. Os animais foram descerebrados, foram retiradas amostras de músculo, para análise molecular, e dois arcos do lado direito, para técnica de imunofluorescência. As amostras foram armazenadas a -80°C.

## 2.2. *Dosagens plasmáticas*

As dosagens plasmáticas de osmolalidade e íons foram feitas apenas para *R. quelen*. A osmolalidade do plasma foi mensurada utilizando micro-osmômetro de pressão de vapor Vapro 5520 (Wescor, USA). A concentração de íons cloreto foi determinada utilizando kit comercial (Labtest, Brasil) através de leitura em absorbância de 470 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 2100 PRO Amersham Pharmacia biotech). As concentrações de íons sódio e potássio foram determinadas por leitura em fotômetro de chama (Fotômetro Micronal B462, Brasil) em amostras diluídas na proporção 1:1000.

## 2.3. *Ensaio enzimáticos*

### 2.3.1. *Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-ATPase*

Para determinação da atividade das enzimas Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-ATPase foi utilizado o protocolo estabelecido por Kültz e Somero (1995) e modificado por Duarte *et al.* (2013). O ensaio se baseia na reação de redução do NADH pela reação enzimática acoplada ao mecanismo de hidrólise do ATP. Uma fração de tecido branquial e renal (1 parte de tecido em 10 de tampão) de *R. quelen* foi homogeneizada em tampão SEID (Sacarose 150mM, Imidazol 50mM, EDTA 10mM, ácido deoxicólico 0,5%, pH 7,5). O homogeneizado foi centrifugado por 5 minutos a 2.000 xg a 4°C e retirado o sobrenadante. O total de 5µl do

sobrenadante foi adicionado, juntamente com 200 µl de solução de reação (Imidazol 30mM, NaCl 45mM, KCl 15mM, MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 3mM, KCN 0,4mM, 1.0mM de ATP, 0,2mM de NADH, 3IU/ml de PK, 2IU/ml de LDH, 0,1mM de Frutose-1,6-Difosfato e 2mM de PEP), a cada poço de uma única linha da microplaca (12 poços), totalizando um total de 8 amostras por placa. As amostras foram divididas em quadruplicatas, sendo nas 4 primeiras réplicas adicionado somente a solução de reação sem inibidores. Nas outras 4 foi adicionada solução de reação contendo 2mM de oabaina (inibidor da NKA) e nas 4 últimas réplicas foi adicionada a solução contendo 2mM de N-etil-etanolamina (inibidor da H-ATPase). A leitura foi realizada em absorbância de 370 nm (Tecan Infinite M200, Áustria) a temperatura ambiente. A inclinação da reta de regressão linear obtida pela taxa de oxidação do NADH pelo tempo foi usada para determinação da atividade da NKA e HA. A unidade obtida para ambas as enzimas foi de mmol ATP h<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>. Para determinação das proteínas totais no sobrenadante do tecido branquial e renal foi utilizado método estabelecido por Bradford (1976).

$$\text{Atividade} = \{(\text{inclinação} * 56,6) / ([\text{Proteínas}] * 0,005) * 60 / 1000\} * -1$$

### 2.3.2. Anidrase Carbônica

Para determinação da atividade da enzima Anidrase Carbônica (AC) foi utilizado o protocolo estabelecido por Vitale *et al.* (1999). Amostras de *R. quelen* de brânquia e rim foram pesadas, homogeneizadas em 10% P/V (peso/volume) de tampão manitol (225mM), sacarose (75mM) e tris-fosfato (10mM), pH ajustado em 7,4, e centrifugadas a 13.400 xg por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e utilizado para o protocolo da atividade da enzima.

O protocolo experimental consiste na utilização de 7,5mL de tampão (mesmo utilizado na homogeneização), acrescido de 0,05mL do sobrenadante homogeneizado e 1mL de água deionizada a 2,5°C, saturada com CO<sub>2</sub>. Uma reta de regressão linear é obtida através da medição da queda de pH da amostra logo após o acréscimo da água saturada com CO<sub>2</sub> em intervalos de 4 segundos (durante 20 segundos) utilizando pHmetro de bancada (inoLAB pH level 1 da WTW®, Alemanha). O gráfico da reta de regressão linear gerado forneceu a inclinação da reta, que corresponde a Taxa de reação Catalisada (TC). Também foi obtido o valor da Taxa de reação Não Catalisada (TNC), através da substituição da amostra por 0,05mL do tampão. A partir desses dois valores gerados, a Atividade da Anidrase Carbônica (ACC) foi calculada utilizando a fórmula:

$$\text{AAC} = [\text{TC}/\text{TNC} - 1] / \text{mg proteína total.}$$

Para determinação das proteínas totais no sobrenadante do tecido branquial e renal foi utilizado método estabelecido por Bradford (1976).

#### **2.4. Expressão de proteínas por Western Blotting**

Parte do tecido branquial retirado de *R. quelen* e do tecido muscular de *C. parallelus* foi homogeneizada durante 5 minutos em tampão de homogeneização (HEPES 20 mM, NaCl 15 mM, Triton X-100 1%, NP-40 1%) em conjunto com inibidores de proteases (Benzamidina 20 mM, EDTA 10 mM, Iodocetamida 10 mM, Pepstatina 5µg/mL, Fenantrolina 5 mM, PMSF 2 mM). Após a homogeneização o material foi centrifugado a 13.400 xg por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante retirado e congelado a -80 °C.

Para determinação das proteínas totais no sobrenadante foi utilizado o método de Bradford (1976). Uma alíquota do extrato de proteínas (contendo 150µg de proteína total do sobrenadante extraído do músculo de *C. parallelus* e 200 µg de proteína total do sobrenadante extraído das brânquias de *R. quelen*) foi diluída em tampão de amostra redutor e então submetida ao gel de corrida eletroforética (acrilamida 10%) em tampão Tris-base 150 mM contendo SDS 1 mM (pH 8,8), seguido do gel de empilhamento (acrilamida 5%) também em tampão Tris-base 50 mM contendo SDS 1 mM (pH 6,8). Para a corrida, foi utilizado tampão Tris-Glicina (pH 8,3) contendo SDS, durante aproximadamente 4 horas com corrente constante de 10-15 mA. Após a corrida, o gel contendo os peptídeos foi submetido à transferência para a membrana de nitrocelulose em câmara de Western Blotting contendo tampão de transferência composto por Tris-Base, Glicina, SDS 10% e Metanol 20%. A transferência foi realizada em corrente de 120-135 mA e 25 mV *overnight* a ~4°C. A membrana foi retirada, a faixa com o marcador de peso molecular foi cortada, e então foi bloqueada em tampão TBST (NaCl 120mM, TRIS-HCl 20mM pH 7,4 e Tween-20 0,05%) contendo leite em pó Molico (Nestlé®) 5% por 1 hora, para bloqueio dos sítios não específicos. Após o bloqueio a membrana foi incubada por duas horas com anticorpo primário específico para cada análise. Para amostras de músculo de *C. parallelus* foi utilizado anticorpo primário anti-HSP70 (marca BD). As membranas que continham as amostras de tecido branquial de *R. quelen* foram incubadas com anticorpo primário anti anidrase carbônica (CAII IgG, produzido em coelho, Abcam, Cambridge, MA) e anti-HSP70 (marca BD). Em seguida a membrana foi lavada em tampão TBST e posteriormente incubada com anticorpo secundário (anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina) por duas horas à temperatura ambiente. A membrana foi lavada com tampão TBST e em seguida foi coberta com

cromógenos da fosfatase alcalina Premixed BCIP/NBT, permanecendo nesta solução por ~20 minutos ou até completo aparecimento das bandas proteicas. Após a revelação, a membrana de nitrocelulose foi mergulhada em água destilada para parar a reação.

A membrana foi então digitalizada e a expressão das proteínas foi quantificada através da análise de intensidade relativa de cinza das bandas, utilizando-se o programa ImageJ.

## 2.5. *Imunofluorescência*

O tecido branquial de *R. quelen* e *C. parallelus* foi fixado em paraformaldeído 2% em tampão fosfato (PBS) ( por 3 horas. Em seguida, o material foi incubado em PBS com sacarose 5% por 2 horas e em PBS com sacarose 15% *overnight* a 4°C para preservação do material durante o congelamento. As brânquias foram então incluídas em meio OCT (solução crioprotetora de seccionamento de temperatura ótima, Tissue-Tek) e imediatamente congeladas a -20°C com posterior armazenamento em freezer -80°C. Os blocos de OCT contendo as lamelas branquiais foram cortados em criostato (Criostato leica® CM1850) na espessura de 10 a 12 µm e os cortes foram colocados em lâminas de vidro preparadas em solução de 3-Aminopropil trietoxissilano para adesão dos cortes.

Para início do protocolo de marcação os cortes foram lavados com PBS e PBS com glicina 0,1 M para bloqueio das cadeias aldeídicas livres. O material foi então bloqueado em PBS com soro albumina bovina (BSA) a 1% e incubado em câmara úmida a 4°C *overnight* (nos cortes de *R. quelen*) ou a 4°C por 2 horas (nos cortes de *C. parallelus*) com anticorpo primário anti- $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (subunidade  $\alpha 5$ , anti camundongo, Banco de Estudos de Desenvolvimento de Hibridoma, Departamento de Ciências biológicas), anti-anidrase carbônica (CAII IgG, produzido em coelho, Abcam®, Cambridge, MA) e anti-V-ATPase (B1/2 H-180, produzido em coelho, Santa Cruz Biotechnology®). Para *C. parallelus* não houve marcação com anti-V-ATPase e os cortes foram incubados com anti-NKCC (produzido em camundongo, T4, anti-cotransportador  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  da cripta colônica humana, células T84, Banco de Estudos de Desenvolvimento de Hibridoma, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade de Iowa, EUA). Todos os anticorpos foram diluídos na proporção 1:100 em PBS com BSA 0,1%. Após a incubação, os cortes foram lavados em PBS, bloqueados com BSA 1% e então incubados por 2 horas a temperatura ambiente (para *R. quelen*) ou a 4°C *overnight* (para *C. parallelus*), em câmara úmida escura, com anticorpo secundário anti-camundongo IgG produzido em cabra e conjugado com o fluorocromo

fluoresceína (FITC) (Pierce, EUA) e com anticorpo secundário anti-coelho IgG produzido cabra e conjugado com o fluorocromo rodamina (TRITC) (Pierce, EUA), diluídos 1:100 em PBS com BSA 0,1%. Para confirmação da efetiva marcação entre o anticorpo primário e as proteínas de interesse, foram feitas incubações somente com o anticorpo secundário, resultando em um controle negativo para cada espécie em cada condição experimental. A seguir, o material foi lavado em PBS para montagem com Fluormount (Meio de montagem aquoso, Sigma-Aldrich) e lâminulas, sempre protegidos da luz. As lâminas de *R. quelen* foram observadas e fotografadas em microscópio de epifluorescência (Zeiss), acoplado ao software para foto-documentação Leica Application Suite (Versão 3.1.0), enquanto as lâminas de *C. parallelus* foram fotografadas utilizando microscópio motorizado de epifluorescência Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE), equipado com um scanner automatizado VSlide (Metasystems, Altussheim, DE).

As lâminas foram analisadas e quantificadas a partir das fotos digitais das lamelas branquiais por meio do programa ImageJ.

## **2.6. Análise estatística**

O tratamento estatístico se deu utilizando o test-*t* de student para comparação dos fatores salinidades para cada espécie (água doce e salinidade 15‰ em *R. quelen*; água do mar e água doce em *C. parallelus*). Os resultados foram expressos na forma de média±erro padrão da média com nível de significância (P) <0,05.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Osmolalidade e íons

Não houve diferença entre os valores encontrados da osmolalidade e íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$  nas amostras de plasma do grupo exposto à salinidade 15‰ comparado ao grupo controle (água doce) de *R. quelen* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Medida da osmolalidade e da concentração iônica plasmática (média±erro padrão) de *R. quelen* exposto por 6 horas à água doce (controle) e a salinidade 15‰.

Variável	Controle (n=5)	15‰ (n=4)
Osmolalidade (mOsm/kgH <sub>2</sub> O)	274,8±17,5	251,7±6,43
[Na <sup>+</sup> ] (mM)	159,8±14,2	156,8±16,2
[Cl <sup>-</sup> ] (mM)	149,8±7,35	143,7±13,3
[K <sup>+</sup> ] (mM)	4,22±0,55	4,65±0,92

#### 3.2. Atividade da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, $\text{H}^+$ -ATPase e Anidrase Carbônica

A atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e  $\text{H}^+$ -ATPase, e da enzima intracelular anidrase carbônica nas brânquias e nos rins de *R. quelen* não diferiram entre o grupo experimental exposto a salinidade 15‰ e controle em água doce. Também não houve diferença na atividade ATPásica total entre as condições experimentais (Tabela 2).

Quando comparadas as atividades da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e  $\text{H}^+$ -ATPase e da atividade ATPásica total entre a brânquia e o rim, os valores da atividade renal foram maiores tanto no grupo controle em água doce quanto no experimental em 15‰ (Tabela 2).

**Tabela 2.** Atividade das enzimas Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, H<sup>+</sup>-ATPase (mmol ATP h<sup>-1</sup> mgproteína<sup>-1</sup>), Anidrase Carbônica (/mg de proteína) e atividade ATPásica total (mmol ATP h<sup>-1</sup> mgproteína<sup>-1</sup>) branquial e renal (média±erro padrão) de *R. quelen* exposto por 6 horas a água doce (controle) (n=5) e à salinidade de 15‰ (n=5). † indica diferença entre a atividade ATPásica no rim e nas brânquias (P<0,05).

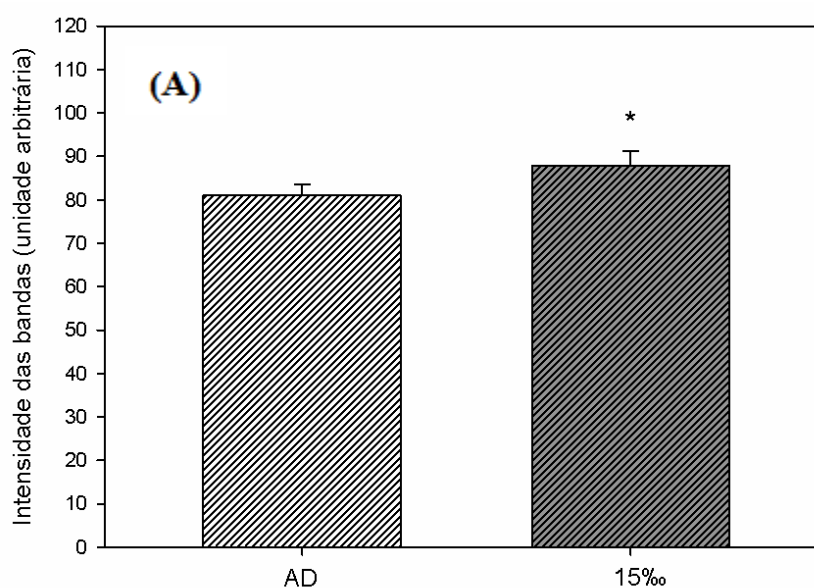
Atividade Enzimática Branquial	Controle (n=5)	15‰ (n=5)
ATPase Total	1,74±0,64	1,81±0,3
Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase	0,43±0,1	0,47±0,07
H <sup>+</sup> -ATPase	0,37±0,19	0,38±0,12
Anidrase Carbônica	9,2±3,68	13,47±4,05

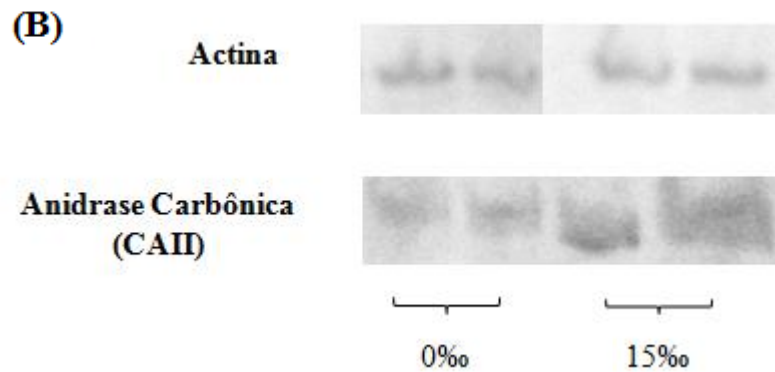
Atividade Enzimática Renal	Controle (n=5)	15‰ (n=5)
ATPase Total	2,74±0,49 †	2,3±0,11 †
Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase	1,35±0,43 †	1,05±0,24 †
H <sup>+</sup> -ATPase	0,79±0,17 †	0,78±0,31 †
Anidrase Carbônica	11,06±2,99	9,73±2,58

### 3.3. Expressão da enzima Anidrase Carbônica

A expressão da enzima anidrase carbônica detectada por Western blotting e quantificada através da intensidade das bandas (unidade arbitrária), foi maior no grupo exposto a 15‰ (87,8±3,37ua) do que no grupo controle em água doce (81,1±2,47ua) de *R. quelen*.





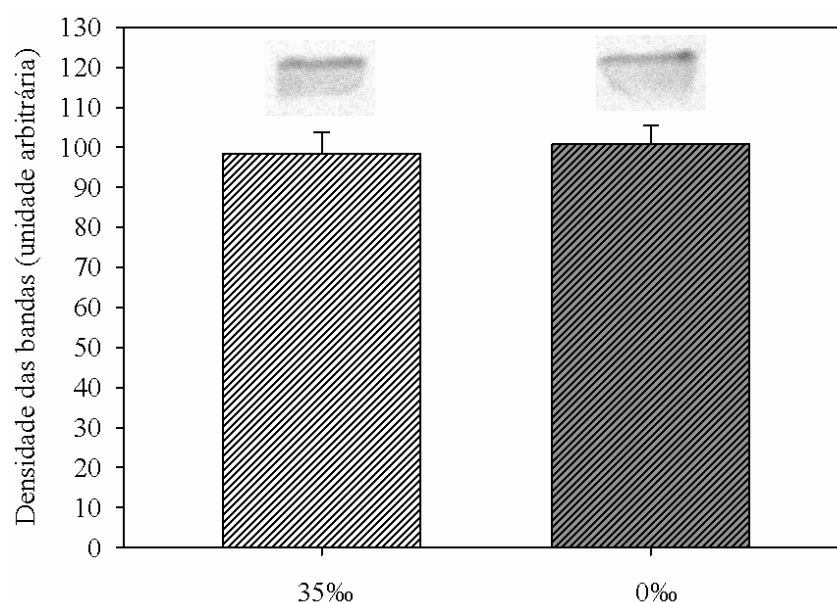


**Figura 5.** Expressão relativa da enzima Anidrase Carbônica (CAII) (média±erro padrão, unidade arbitrária) em brânquia de *R. quelen* expostos por 6 horas a água doce (controle) e a salinidade 15‰ (n=5). \* indica diferença significativa entre os grupos ( $P<0,05$ ) (B). O controle positivo do ensaio de Western Blotting foi realizado através da quantificação das bandas da proteína Actina (B).

### 3.4. Expressão da proteína HSP70

#### 3.4.1. *C. parallelus*

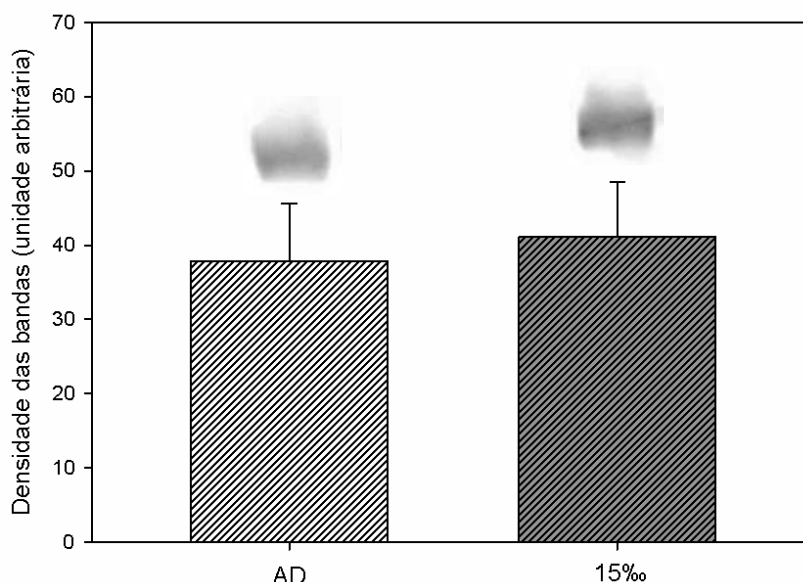
Os valores das intensidades das bandas de HSP70 quantificadas de *C. parallelus* em amostras de músculo dos animais controle mantidos em água do mar (35‰) ( $98,4\pm5,36$  ua) não diferiram dos valores obtidos no grupo experimental exposto por 10 dias em água doce (100,8±4,66 ua) (Fig. 6).



**Figura 6.** Expressão de HSP70 (média±erro padrão, unidade arbitrária) em músculo de *C. parallelus* mantidos em salinidade 35‰ (n=5) e expostos por 10 dias a água 0‰ (n=5). Não foram observadas diferenças entre os grupos.

### 3.4.2. *R. quelen*

A expressão de HSP70 branquial quantificada através da intensidade das bandas de *R. quelen* não diferiu entre o grupo controle mantido em água doce (37,9±7,72 ua) e o grupo experimental exposto por 6 horas em salinidade 15‰ (41,1±7,42 ua) (Fig. 7).

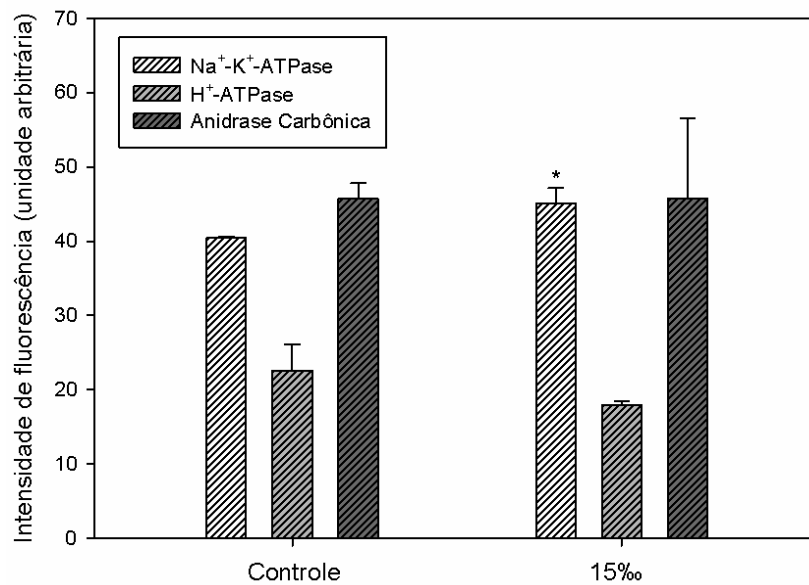


**Figura 7.** Expressão de HSP70 (média±erro padrão, unidade arbitrária) em brânquia de *R. quelen* mantidos em água doce (controle, AD) (n=5) e expostos por 6 horas a salinidade 15‰ (n=5). Não foram observadas diferenças entre os grupos.

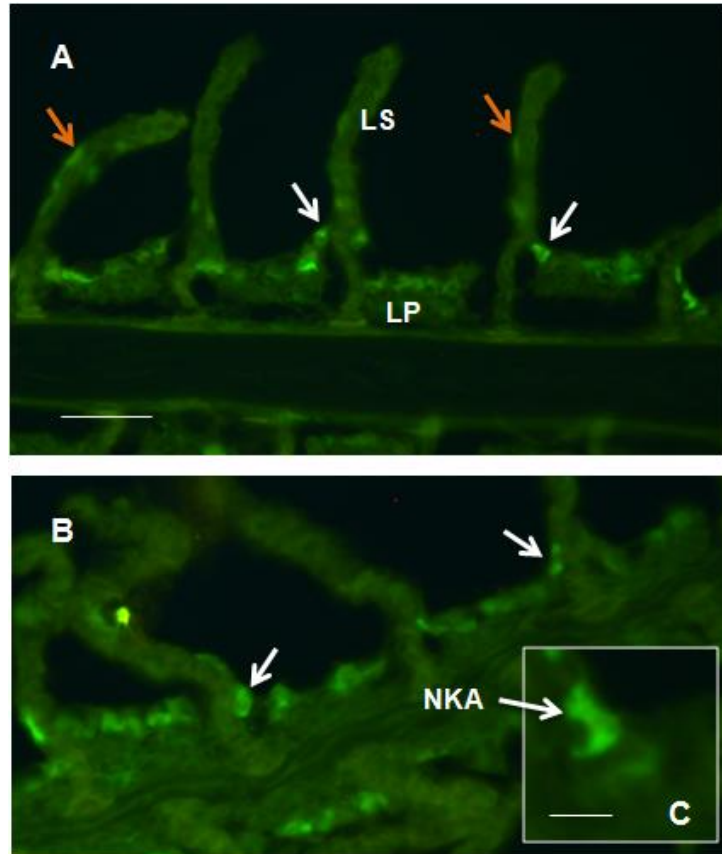
### 3.5. Expressão e localização por imunofluorescência

A intensidade da fluorescência e consequente abundância relativa dos transportadores  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (NKA),  $\text{H}^+$ -ATPase,  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  e da enzima anidrase carbônica no tecido branquial foram detectadas pela técnica de imunofluorescência. Houve um aumento na expressão de NKA branquial de *R. quelen* no grupo exposto a 15‰ em 6 horas (45,1±2,09ua) quando comparados ao grupo controle em água doce (40,4±0,15ua). A expressão da  $\text{H}^+$ -ATPase e da enzima anidrase carbônica não diferiu entre os grupos (Fig. 8). A marcação da NKA e da  $\text{H}^+$ -ATPase foi mais intensa nas células (MRCs) da região de interseção entre a lamela primária e a lamela secundária em ambos os grupos (Fig. 9 e 10). A enzima intracelular anidrase carbônica apresenta-se marcada de forma homogênea e intensa por todo tecido branquial, incluindo células sanguíneas. No entanto houve uma evidente marcação próxima a membrana apical das MRCs (Fig. 11C) e a porção quantificada foi a partir da fluorescência identificada nessas células, localizadas na região interlamelar do epitélio branquial (Fig.11).

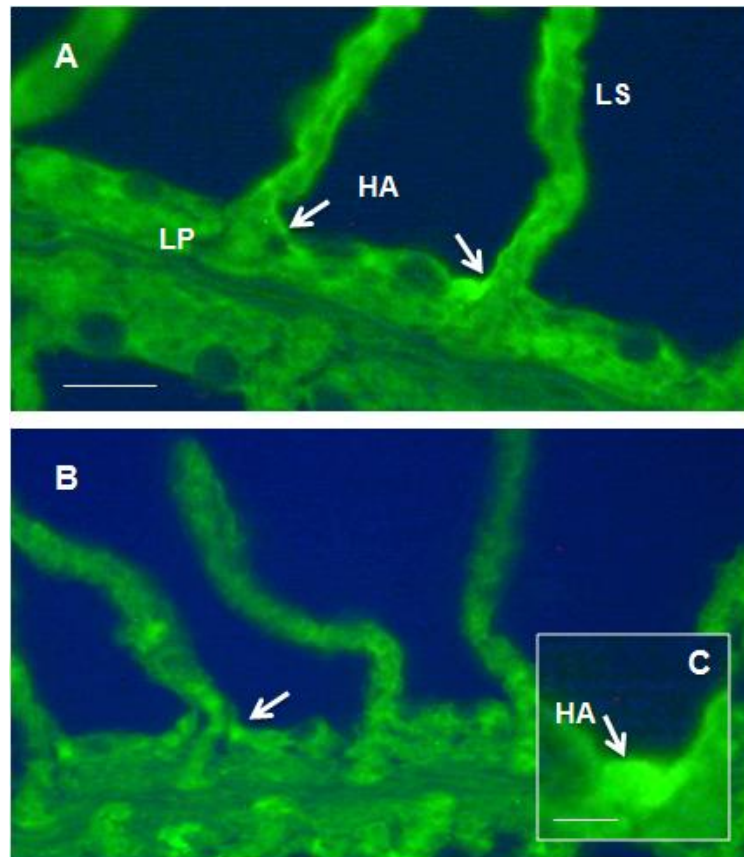
Na espécie *C. parallelus* não foram encontradas diferenças na expressão da NKA, do cotransportador NKCC e da enzima anidrase carbônica entre os animais expostos a água doce durante 10 dias quando comparado ao animais controle mantidos em água do mar (Fig. 12). A marcação com NKA e NKCC foi mais evidente nas MRCs da região de interseção entre a lamela primária e secundária (Fig. 13 A, D; Fig. 14). A NKA e o NKCC foram localizados na membrana basolateral das MRCs (Fig. 13h, i; Fig. 14C). Não foi possível identificar se houve alteração nos padrões de localização dos transportadores após transferência para meio diluído. A enzima anidrase carbônica, da mesma forma que em *R. quelen*, esteve localizada difusa por todo tecido branquial, mas a quantificação foi realizada na região de interseção entre as lamelas primárias e secundárias (Fig. 13g, B, E).



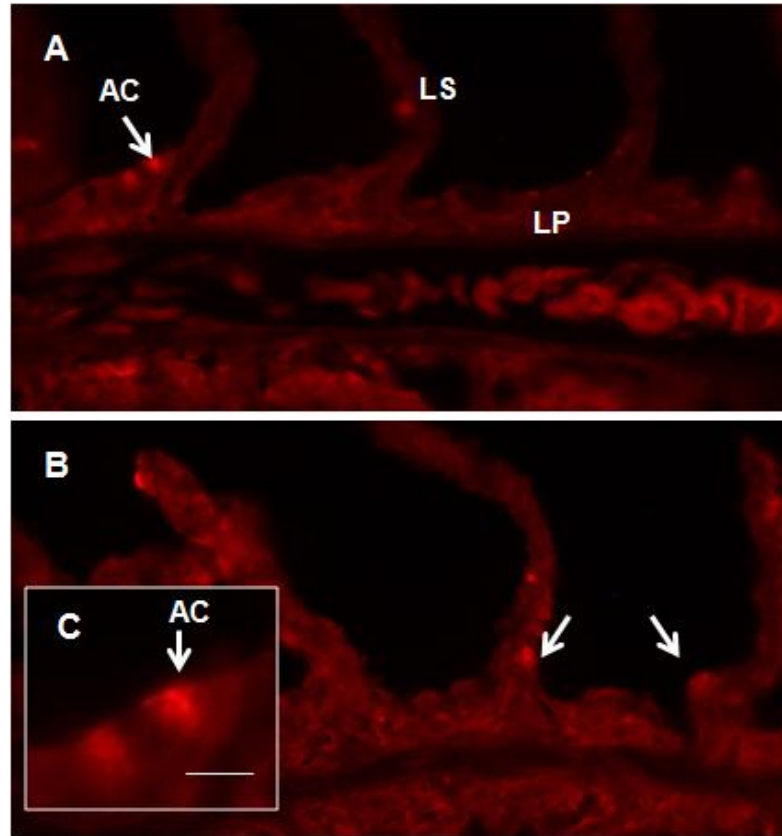
**Figura 8.** Intensidade de fluorescência (média±erro padrão, unidade arbitrária) das Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-ATPase e da enzima intracelular anidrase carbônica do tecido branquial de *R. quelen* expostos por 6 horas a água doce (controle) (n=5) e a salinidade 15‰ (n=5). \* indica diferença significativa na expressão de NKA entre os grupos experimental (15‰) e controle (água doce) ( $P<0,05$ ).



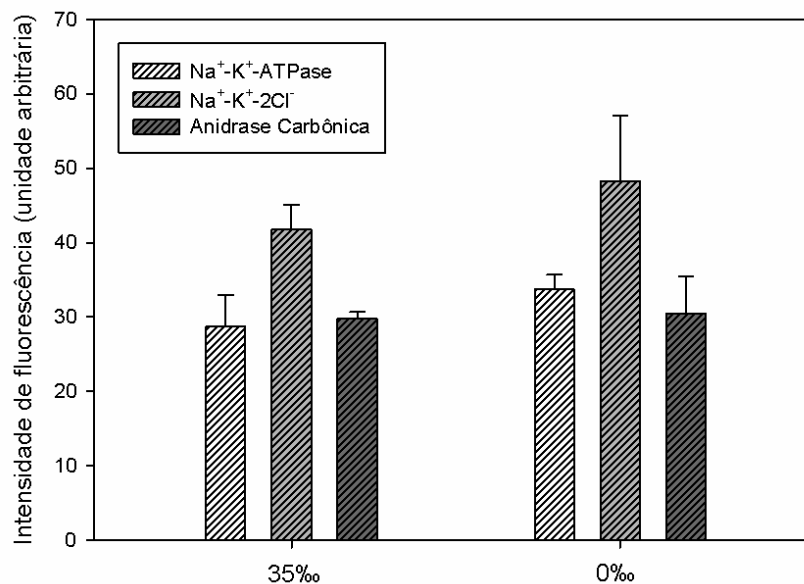
**Figura 9.** Imunofluorescência da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase (NKA –  $\alpha 5$ ) no epitélio branquial de *R. quelen* exposto por 6 horas a água doce (controle) (A) e salinidade 15‰ (B). As setas brancas indicam o sinal da NKA nas MRCs localizadas na interseção entre a lamela primária (LP) e a lamela secundária (LS). As setas laranjas indicam células reativas a NKA nas lamelas secundárias. Barra de escala (A-B): 50 $\mu\text{m}$ . Localização basolateral da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase nas MRCs (C). Barra de escala (C): 10  $\mu\text{m}$ .



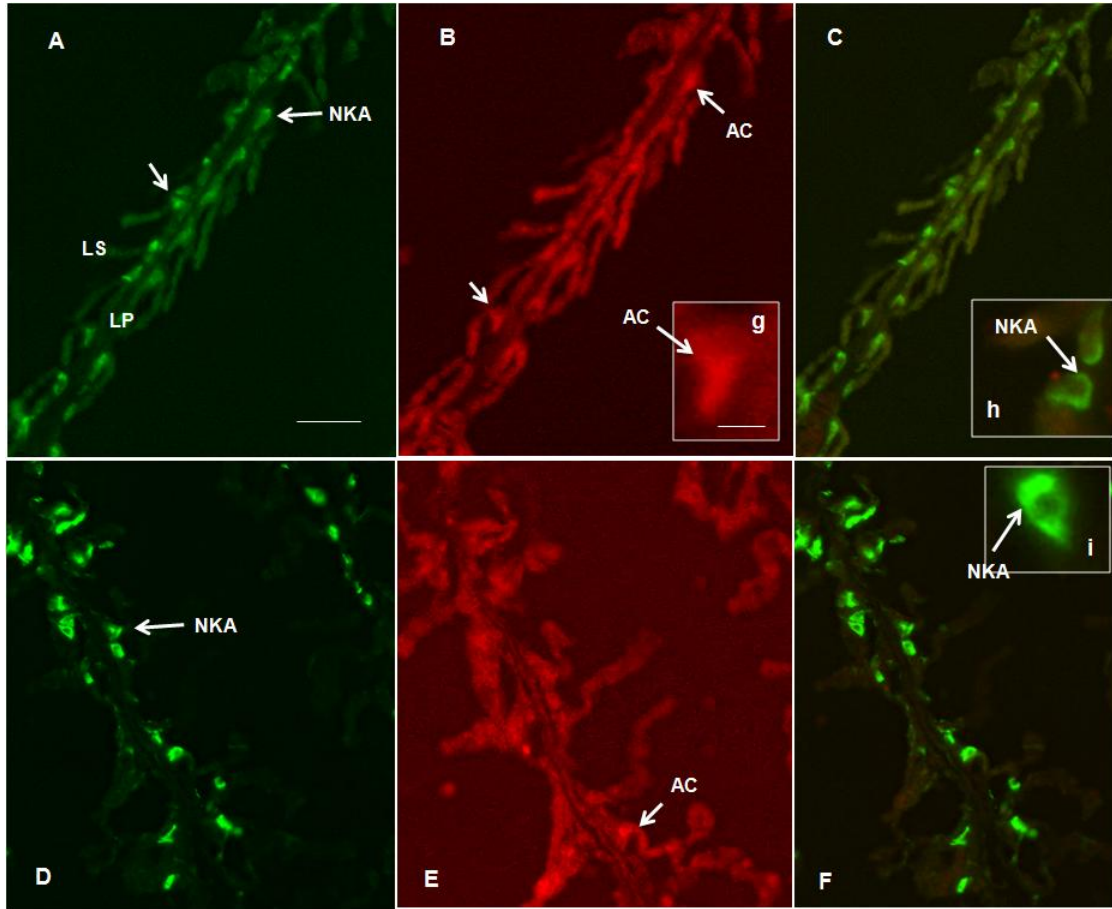
**Figura 10.** Imunofluorescência da H<sup>+</sup>-ATPase (HA) no epitélio branquial de *R. quelen* exposto por 6 horas a água doce (controle) (A) e salinidade 15‰ (B). As setas brancas indicam o sinal da HA nas MRCs localizadas na interseção entre a lamela primária (LP) e a lamela secundária (LS). Barra de escala (A-B): 50μm. Localização apical da H<sup>+</sup>-ATPase nas MRCs (C). Barra de escala (C): 10 μm.



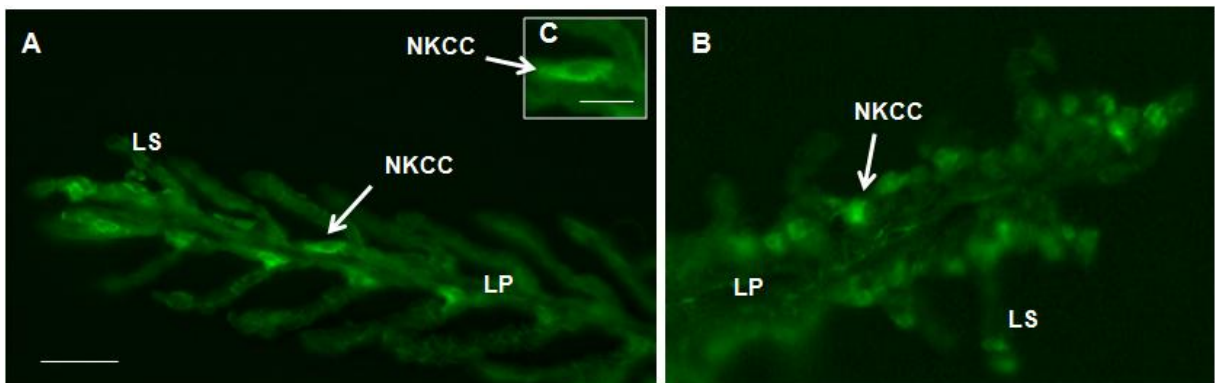
**Figura 11.** Imunofluorescência da Anidrase Carbônica (AC - CAII) no epitélio branquial de *R. quelen* exposto por 6 horas a água doce (controle) (A) e salinidade 15‰ (B). As setas brancas indicam o sinal da AC nas MRCs localizadas na interseção entre a lamela primária (LP) e a lamela secundária (LS). Barra de escala (A-B): 50µm. Distribuição da Anidrase Carbônica nas MRCs (C). Barra de escala (C): 10 µm.



**Figura 12.** Intensidade de fluorescência (média ± erro padrão) em unidade arbitrária das Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,2Cl<sup>-</sup> e da enzima intracelular anidrase carbônica do tecido branquial de *C. parallelus* no grupo em salinidade controle (35‰) (n=5) e no grupo exposto por 10 dias em água doce (0‰) (n=5) .



**Figura 13.** Imunofluorescência em verde (FITC)  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  (A), em vermelho (TRITC) anidrase carbônica (B), a sobreposição das duas proteínas (C) e a ampliação das MRCs localizadas na interseção entre as lamelas primária (LP) e secundária (LS) do epitélio branquial de *C. parallelus* mantido em água do mar (controle). Em verde (FITC)  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  (D), em vermelho (TRITC) anidrase carbônica (E), a sobreposição das duas proteínas (F) e a ampliação das MRCs interlamelares dos animais expostos a salinidade 0‰ por 10 dias. Barra de escala (A-F): 50μm. Em g está indicada marcação difusa da enzima anidrase carbônica. Em h e i estão indicadas a localização basolateral da  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ . Barra de escala (g-i): 10 μm.



**Figura 14.** Imunofluorescência do cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  nas MRCs localizadas na interseção entre as lamelas primária (LP) e secundária (LS) do epitélio branquial de *C. parallelus* exposto por 10 dias a salinidade 35‰ (controle) (A) e a água doce (B). Localização basolateral do cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ . (C) Barra de escala (A-B): 20μm; Barra de escala (C): 10 μm.



## 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

### 4.1. Osmorregulação em *R. quelen*

A espécie dulcícola *Rhamdia quelen* submetida à transferência abrupta da água doce para salinidade 15‰ por 6 h demonstrou elevada capacidade osmorregulatória, mantendo os níveis plasmáticos de osmolalidade e concentração dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , e  $\text{K}^+$  estáveis frente ao choque hiperosmótico (Tabela 1). Quando exposta a salinidades mais elevadas (25‰ por uma hora), essa espécie apresenta aumento da concentração plasmática dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , além da redução da hidratação muscular (Souza-Bastos e Freire 2009). A redução da hidratação muscular e aumento dos níveis de HSP70 expressos também foram observados nos indivíduos dessa espécie expostos à salinidade 15‰ por 6 h (apesar da ausência de alteração na osmolalidade plasmática) e na exposição à 30‰ por 1,45 h (tempo limite de sobrevivência) na qual houve elevação da osmolalidade plasmática (Gutierre *et al.* 2013). Apesar de alterado o conteúdo hídrico muscular no aumento de salinidade até 25‰ por 1 hora não houve alteração no conteúdo hídrico do tecido branquial (Souza-Bastos e Freire 2009), o que pode estar associado à inalteração da expressão de HSP70 nas brânquias em *R. quelen* exposto a salinidade 15‰. A ausência de alterações osmo-iônicas e manutenção da homeostase para essa espécie frente à exposição a salinidade 15‰, indicam que apesar de ser um peixe Ostariophysi (com origem primária em água doce) (Myers 1949; Nelson 2006) *R. quelen* apresenta-se eurihalino nessas condições, corroborando dados anteriores obtidos sobre essa espécie (Souza-Bastos e Freire 2009; Gutierre *et al.* 2013; Vitule *et al.* 2013).

Alterações ou mecanismos compensatórios podem ser ativados para garantir a homeostase hidroeletrolítica plasmática. A elevada razão entre a concentração osmótica da água salobra e a concentração osmótica plasmática reflete no ganho passivo de íons e perda de água pelas brânquias. Respostas celulares rápidas, associadas simultaneamente a outros mecanismos compensatórios, envolvendo regulação de volume celular e regulação da composição do extracelular através do transporte vetorial de sal nas células especializadas no epitélio branquial (MRCs), garantem o reestabelecimento da homeostase do meio interno (Freire *et al.* 2008b; Marshall 2011; Hiroi e McCormick 2012).

Alterações na atividade, expressão e localização de proteínas como a NKA e  $\text{H}^+$ -ATPase e enzima anidrase carbônica de teleósteos dulcícolas ilustram algumas das possíveis respostas que os animais podem exibir frente ao choque osmótico. A espécie *R. quelen* não apresentou alteração na atividade enzimática branquial e renal destes transportadores, o que



indica que a manutenção da homeostase osmo-iônica verificada não depende diretamente da alteração das atividades da NKA, H<sup>+</sup>-ATPase e anidrase carbônica branquial. Nos rins foram encontrados maiores valores de atividade ATPásica total, da NKA e da H<sup>+</sup>-ATPase, do que o encontrado nas brânquias (Tabela 2). Outros trabalhos encontraram resultados semelhantes, como a maior atividade da NKA nos rins quando comparada a atividade branquial da espécie de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Gilmour *et al.* 2012). A maior atividade das enzimas avaliadas no tecido renal reflete o papel do rim na osmorregulação dos peixes dulcícolas. O processo de ultrafiltração glomerular dos rins de peixes dulcícolas associado à baixa permeabilidade tubular a água, e intensa reabsorção tubular de íons monovalentes, garantem a produção de grande quantidade de urina hipo-osmótica. A ausência da alça de Henle nos néfrons dos rins dos teleósteos impossibilita a formação de uma urina concentrada (em relação ao plasma), e quando um peixe é transferido da água doce para salinidade mais elevada, o excesso de íons divalentes é secretado pelos rins, mas os íons monovalentes (*p. ex.*, Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>) são eliminados através da secreção ativa pelo epitélio branquial (Marshall e Grosell 2005; Evans 2008). Quando um organismo é transferido do meio hipo-osmótico para o meio hiper-osmótico a reabsorção de íons monovalentes pelos rins e a produção de urina em abundância devem ser revertidas para produção de pequena quantidade de urina isosmótica, compensando a entrada de sal passiva em ambiente salobro (Lin *et al.* 2004; Marshall e Grosell 2005; Laverty e Skadhauge 2012). Essas características determinam a importância dos rins nos mecanismos osmorregulatórios de absorção de sal em espécies dulcícolas.

A localização dos transportadores iônicos branquiais, detectada por imunofluorescência, encontrada em *R. quelen* aclimatado a salinidade 15‰ durante 6 h, corrobora os modelos descritos nas brânquias de peixes dulcícolas. A marcação contra a subunidade  $\alpha$ -5 da NKA foi evidente nas MRCs localizadas na interseção entre a lamela primária e a lamela secundária (Fig.9). As MRCs são caracterizadas por conter muitas mitocôndrias, dobramentos basolaterais distintos ricos em NKA e elevada atividade (Wilson e Laurent 2002; Evans *et al.* 2005). As MRCs são comumente localizadas nas regiões interlamelares, porém, podem ser encontradas nas lamelas secundárias de algumas espécies de água doce, com posição e morfologia alteradas por exposição ao choque osmótico (Wilson e Laurent 2002; Evans *et al.* 2005). A marcação da NKA em *R. quelen* foi também localizada em algumas células da lamela secundária em ambas as condições. Apesar dessa marcação não ser recorrente nas lamelas secundárias como é nas lamelas primárias, algumas espécies

apresentam alterações nos padrões de localização de células reativas a NKA quando expostas ao choque hiper-osmótico (revisado em Wilson e Laurent 2002).

Houve aumento na abundância relativa da NKA branquial de *R. quelen* frente ao choque hiper-osmótico, apesar da ausência de alteração na sua atividade (Fig. 8). A correlação entre a atividade e abundância relativa de determinada isoforma para a NKA é relativamente complexa, pois a atividade da NKA no tecido é a soma da atividade de muitas isoformas  $\alpha$  catalíticas, quais são conhecidas por ter atividade e expressão alteradas de acordo com a salinidade (Richards *et al.* 2003; Bystriansky *et al.* 2006; Saéz *et al.* 2009). A expressão gênica das isoformas  $\alpha$  da NKA pode apresentar grande variação intraespecífica (Saéz *et al.* 2009). Na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) aclimatada em meio com salinidade de 95% da água do mar, a expressão de RNAm branquial das isoformas  $\alpha 1a$  e  $\alpha 1b$  demonstrou aumento apenas da isoforma  $\alpha 1a$  quando os animais foram expostos a diluição de salinidade (7,4‰) por 6 e 24 horas (Gilmour *et al.* 2012). Na espécie *Salmo salar* a abundância da subunidade  $\alpha 1a$  foi maior nas brânquias dos peixes aclimatados em água doce enquanto que a abundância da subunidade  $\alpha 1b$  e a atividade da NKA foi maior nas brânquias quando aclimatados em água do mar (McCormick *et al.* 2009). Muitos trabalhos utilizam o anticorpo contra a isoforma  $\alpha 5$  para caracterizar a localização e expressão da NKA no tecido branquial (Dang *et al.* 2000; Wilson *et al.* 2000a; McCormick *et al.* 2009; Yang *et al.* 2011; Kang *et al.* 2012). Tais diferenças entre as subunidades da isoforma  $\alpha$  catalítica podem explicar o aumento da abundância relativa no epitélio branquial não ser acompanhada do aumento da atividade enzimática da NKA.

A enzima anidrase carbônica foi localizada em todo o epitélio branquial de *R. quelen* de forma difusa em todas as células, corroborando ao encontrado em outro estudo, no qual a enzima está presente nas células pavimentares, células mucosas, células pilares e nas MRCs (Sender *et al.* 1999), porém foi encontrada uma maior marcação da enzima próxima a membrana apical das MRCs, assim como em outros teleósteos dulcícolas e na lampreia *Geotria australis* a abundância da enzima é maior nas porções apicais das células reativas a  $H^+$ -ATPase (Rahim *et al.* 1988; Wilson *et al.* 2000b; Choe *et al.* 2004). A abundância da proteína localizada próxima a membrana apical pode estar relacionada com a absorção de NaCl em água doce, na qual a associação à uma proteína de membrana forma complexos proteicos denominados “*metabolons*”, como por exemplo, a ligação da isoforma CA2 com o trocador iônico apical  $Cl^-/HCO_3^-$  (AE1) de eritrócitos e células intercalares renais do tipo A (Reinhart e Reithmeier 2001), e a ligação das isoformas CA2a e CA15a com o trocador

NHE3b apical em larva de *Danio rerio*, formando um complexo com papel chave na absorção de  $\text{Na}^+$  em condições de água doce (Ito *et al.* 2013). Esses complexos otimizam a taxa de transporte, já que limitam a perda de íons difusíveis  $\text{H}^+$  e  $\text{HCO}_3^-$  catalisados pela anidrase carbônica (Reinhart e Reithmeier 2001; Sterling *et al.* 2001; Choe *et al.* 2004).

No que se refere à atividade e a expressão da enzima anidrase carbônica branquial, diferentes padrões de resposta podem ser encontrados frente ao choque hiper ou hip-osmótico. Pode ocorrer aumento da atividade e expressão nas brânquias com a diminuição de salinidade (Scott e Schulte 2005), aumento da atividade nas brânquias (Scott *et al.* 2008; Souza-Bastos e Freire 2009), e aumento da expressão relativa da isoforma CA2 branquial em condições hiper-osmóticas (Scott *et al.* 2008). Além disso, a atividade enzimática branquial pode se demonstrar inalterada frente à diluição ou aumento da salinidade (Sender *et al.* 1999; Gilmour *et al.* 2012; Berdan e Fuller 2012). Apesar de encontrado através da técnica de western blotting (Fig. 5) aumento na abundância da enzima em *R. quelen* em 15‰, o aumento da atividade enzimática branquial só foi demonstrado diante de salinidade mais elevada 25‰ (Souza-Bastos e Freire 2009) mesmo em exposição apenas de 1 hora, quando as condições no equilíbrio osmo-iônico já estavam prejudicadas. Essas situações de estresse causadas pelo aumento da salinidade do meio externo refletem em distúrbios metabólicos com consequências, entre outras, no aumento da produção de  $\text{CO}_2$  (Perry e Gilmour 2006). Devido a baixa capacidade de tamponamento por íons bicarbonato nos peixes (Evans *et al.* 2005) o aumento do  $\text{CO}_2$  pode desencadear acidose metabólica (Perry e Gilmour 2006), o que requer aumento da expressão e atividade da anidrase carbônica nas brânquias e nas células eritrocitárias para compensação do equilíbrio ácido-base (Henry e Swenson 2000; Souza-Bastos e Freire 2009).

Em água doce o epitélio branquial de teleósteos deve apresentar redução na permeabilidade e essa característica é definida pela composição das junções intercelulares do epitélio, que são junções fortes (do inglês *tight junctions*), as quais dificultam a perda de sal para o meio (Evans *et al.* 2005; Evans 2011; Chasiotis *et al.* 2012). Para isso, a atividade da NKA é essencial para a geração do gradiente eletroquímico e consequente absorção de sal (íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) (Evans 2011; Laverty e Skadhauge 2012), sendo auxiliada pela  $\text{H}^+$ -ATPase apical (e.g Evans 2011).

A detecção por imunofluorescência indicou a presença da  $\text{H}^+$ -ATPase na região interlamelar e nas lamelas secundárias das brânquias de *R. quelen*. Da mesma forma que o observado no presente estudo, as espécies dulcícolas de tilápia (*Oreochromis mossambicus*) e

de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) apresentaram a marcação da  $H^+$ -ATPase nas células pavimentares do epitélio branquial em água doce, além de também observada marcação da  $H^+$ -ATPase apical nas MRCs (Wilson *et al.* 2000a). Características morfológicas de algumas PVCs também suportam a hipótese de que elas são locais de bombeamento de prótons e absorção de  $Na^+$  (Goss *et al.* 1998; Wilson e Laurent 2002), provavelmente com função no equilíbrio ácido-base (Evans *et al.* 2005). Apesar de ausência de alterações na expressão e atividade da  $H^+$ -ATPase, ela está envolvida na absorção de sal em água doce, e talvez períodos mais prolongados de exposição ao aumento de salinidade possam causar alterações na expressão e/ou atividade.

Na tentativa de elucidar a absorção de sal em água doce, outros modelos de transporte epitelial branquial vêm sendo propostos. Evidências moleculares para a hipótese da presença do  $Na^+/H^+$  (NHE) apical sugerem a participação do trocador na absorção de  $Na^+$  (Wilson *et al.* 2000a; Hirata *et al.* 2003). Na truta arco-íris, a expressão relativa de RNAm para NHE2 foi maior em 24 horas quando em condição isosmótica e não houve alteração na expressão para a  $H^+$ -ATPase (Gilmour *et al.* 2012). Na espécie dulcícola, encontrada em estuários, *Trichogaster microlepis*, também não houve alteração na atividade da  $H^+$ -ATPase quando aclimatada a 10‰ por 4 dias quando comparado ao controle em água doce, porém, a atividade e abundância relativa aumentaram quando exposta à água deionizada (Huang *et al.* 2010). Esses dados sugerem a forte regulação da atividade da  $H^+$ -ATPase em água pobre em íons, e talvez o papel do NHE e a sua modulação (apesar de não quantificado nesse trabalho) sejam mais significativos na transição entre ambientes com salinidades distintas.

Apesar do entendimento sobre a participação dos diferentes transportadores iônicos branquiais na tolerância ao choque osmótico, pouco é discutido sobre o conjunto de transportadores iônicos envolvidos na resposta osmorregulatória dos organismos e sua correlação com o ambiente natural. Essas correlações são pouco abordadas quando tratamos das diferentes respostas da atividade, regulação, expressão gênica e proteica dos transportadores iônicos e grau de eurialinidade das espécies.

A espécie *R. quelen* pertence a ordem Siluriforme que teve origem primária em água doce (Nelson 2006; Froese e Pauly 2007). Nessa ordem, apenas aproximadamente 117 espécies são consideradas marinhas e todas as outras (~ 2.750 espécies) são dulcícolas ou representantes de ambiente salobro (Nelson 2006). Espécies com tempo maior de evolução em água doce devem apresentar mecanismos eficientes para absorção de sal, no entanto, genes relacionados à secreção de sal podem estar ocultos na história evolutiva da espécie. A

salinidade é um fator abiótico determinante do processo de ocupação e invasão de novos ambientes e a pressão exercida por ela é determinante da distribuição de populações em nichos osmóticos distintos (Young *et al.* 2006).

Correlacionando os dados fisiológicos obtidos no laboratório com o histórico de *R. quelen* em seu habitat natural, a espécie pode ser exposta a variações de maré quando ocasionalmente ocorre em regiões estuarinas com salinidade entre 5 e 13‰ (Milani e Fontoura 2007; Vitule 2007). A tolerância a salinidades intermediárias (~15‰) é assegurada por mecanismos osmorregulatórios eficientes que garantem a manutenção da homeostase hidroeletrólítica (Souza-Bastos e Freire 2009), associada ao aumento da expressão de proteínas HSP70 muscular (Gutierrez *et al.* 2013) e elevados níveis constitutivos de HSP70 no tecido branquial (que está em contato direto com as alterações de salinidade), garantindo a viabilidade celular. O aumento da abundância relativa da NKA, que é responsável pela geração de gradientes eletroquímicos tanto em água doce quanto em ambiente salinos, e da anidrase carbônica, responsável pela manutenção do equilíbrio ácido-básico, sugerem a participação das mesmas na tolerância de *R. quelen* ao choque hiper-salino durante exposição de 6 h.

#### **4.2. Osmorregulação em *C. parallelus***

Na espécie marinha estuarina *C. parallelus* não houve alteração na abundância relativa de proteínas HSP70 muscular quando aclimatada por transferência gradual para salinidade 0‰ durante 10 dias. Também não foram encontradas diferenças na abundância relativa branquial da NKA, do cotransportador NKCC e da enzima intracelular anidrase carbônica. A espécie *C. parallelus* apresenta elevado grau de eurihalinidade, podendo ser aclimatada (transferência gradual) de salinidade 35‰ para 0‰, e vice-versa, durante 7 dias sem prejuízos na osmolalidade e concentração de íons cloreto e magnésio plasmáticos (Wosnick 2009). Para sobrevivência e manutenção dos níveis fisiológicos aceitáveis, é necessário desligar a secreção de sal em água do mar e ativar absorção de sal em água doce através de modificações no epitélio das brânquias, intestino e rins (Laverty e Skadhauge 2012; Marshall 2011).

A indução da síntese de proteínas de estresse vem sendo correlacionada como resposta celular ao estresse osmótico em peixes (Deane *et al.* 2002; Gutierrez *et al.* 2013; Tang e Lee 2013). A alteração da salinidade do meio pode acarretar em desequilíbrio osmótico do extracelular e essas alterações são refletidas nas células. As células respondem

com o aumento da síntese de proteínas de estresse HSP70, garantindo a integridade celular. Espécies que ocupam habitats com fatores abióticos variáveis podem apresentar maiores níveis constitutivos de HSPs (Tomanek 2010). A espécie *C. parallelus* é submetida à constante variação na salinidade do seu habitat natural (estuários), logo é esperado que expresse altos níveis de proteínas HSPs constitutivas, sem a necessidade de aumento da síntese dessas proteínas quando exposto a choque osmótico. Nas espécies eurihalinas *Oreochromis mossambicus*, *Tetraodon nigroviridis* e *Chanos chanos*, a aclimação a água doce, 15‰ e 35‰ por 2 semanas não resultou em alteração do teor hídrico muscular e nenhuma alteração na abundância relativa de HSP90 renal (Tang *et al.* 2009). A correlação entre alterações plasmáticas e ausência da expressão de proteínas HSP70 foi encontrada nas espécies de teleósteos dulcícolas *Oreochromis niloticus*, *Ictalurus punctatus* e *Cyprinus carpio*, a qual demonstrou que o grau de eurihalinidade associado a elevados níveis constitutivos da proteína HSP70 pode ser resultado do alto potencial invasor dessas espécies, podendo utilizar os estuários como ponte de dispersão (Gutierrez *et al.* 2013). Em espécies eurihalinas, pertencentes ao grupo Tetradontiforme, com menor grau de eurihalinidade do que os Perciformes (Nelson 2006), como o representante *Takifugu niphobles*, a diminuição da osmolalidade plasmática, quando transferido da água do mar para água doce por 2 semanas, foi acompanhada do aumento da abundância das proteínas HSP70 e HSP90 e do aumento da expressão de RNAm para a isoforma  $\alpha 5$  e atividade da NKA (Tang e Lee 2013).

A isoforma  $\alpha 5$  da NKA e o cotransportador NKCC (T4) foram localizados na membrana basolateral das MRCs da região interlamelar das brânquias e o padrão básico da localização não foi alterado frente a diluição de salinidade (Fig 13A, D; e 14). Independente da salinidade, a marcação contra a isoforma CAII da anidrase carbônica demonstrou distribuição da enzima por toda brânquia, incluindo os eritrócitos presentes nos vasos sanguíneos. A intensidade da marcação da anidrase carbônica foi fraca (Fig. 13B, E) (quando comparada à marcação na brânquia da espécie *R. quelen*, Fig. 11) em ambos os grupos controle e experimental. A comparação entre duas espécies congêneras de killifish que ocupam nichos osmóticos distintos, encontrou maior abundância relativa dos níveis constitutivos de RNAm da isoforma CAII na espécie que ocupa ambiente dulcícola (*Lucania goodei*) do que na espécie eurihalina (*Lucania parva*), encontrada em habitat de água doce, salobro e marinho (Berdan e Fuller 2012). Apesar das discrepâncias envolvendo atividade e expressão da enzima frente ao choque osmótico, com diferentes padrões de resposta ao choque hiper- e hipo-osmótico, o fato da enzima ser menos abundante em espécies marinhas,

não descarta a sua importância na tolerância ao sal, já que a enzima também participa da regulação do equilíbrio ácido-base (Henry e Swenson 2000; Grosell *et al.* 2007; Scott *et al.* 2008; Souza-Bastos e Freire 2009).

A alteração na atividade e abundância da NKA e do cotransportador NKCC vem sendo registrada como resposta à transferência entre meios hiper e hipo-salino (Gonzalez *et al.* 2011; Hiroi e McCormick 2012; Havird *et al.* 2013). Essas mudanças devem ser relativamente rápidas para compensar distúrbios osmo-iônicos e, desta forma, prevenir falência osmorregulatória. A abundância relativa das isoformas pode ocorrer de maneira distinta. Para a NKA, as isoformas  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , e também a  $\alpha 5$ , são bastante expressas em tecidos osmorregulatórios, embora apresentem diferentes padrões temporais e diferente localização. Os genes que codificam as isoformas  $\alpha$  exibem alta variabilidade intraespecífica (Saéz *et al.* 2009). A expressão das isoformas  $\alpha 1a$  e  $\alpha 1b$  aumentou em 12 horas após exposição de killifish a água do mar, com posterior redução e reestabelecimento em 7 dias de exposição (Scott *et al.* 2008). Na espécie marinha *Takifugu niphobles* houve aumento na expressão da isoforma  $\alpha 5$  e na atividade da NKA frente a exposição à água doce por 2 semanas (Tang e Lee 2013). No entanto foi observada ausência de alterações na atividade e expressão da NKA em *C. parallelus* durante 10 dias em água doce.

O aumento da abundância relativa de RNAm e expressão do cotransportador NKCC1 tem sido registrado frente ao aumento de salinidade (Pelis *et al.* 2001; Berdan e Fuller 2012; Kang *et al.* 2012). No entanto, assim como em *C. parallelus*, não foram encontradas diferenças na abundância relativa e na localização do cotransportador NKCC1 em duas espécies estuarinas de baiacu em salinidade 5‰ e 35‰ por 6 h e 5 d (Prodocimo e Freire 2006). A comparação entre duas subespécies de teleósteo eurihalino com diferentes graus de tolerância à água doce demonstrou que a espécie menos tolerante a longos períodos em meio com concentrações de  $\text{Na}^+$  menores que  $2 \text{ mmol l}^{-1}$  utiliza um NKCC apical para absorção de  $\text{Na}^+$ , porém a espécie que habita regiões de baixas concentrações de  $\text{Na}^+$  do meio ( $0.4$  a  $1 \text{ mmol l}^{-1}$ ) parece utilizar outras vias para absorção de  $\text{Na}^+$ , como o trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Brix e Grosell 2011), o que desconsidera a possibilidade de alteração na localização do NKCC nas brânquias, da porção basolateral para a apical, nos mecanismos de absorção de sal em ambientes com baixa concentração de íons  $\text{Na}^+$ .

Outras alterações no epitélio branquial podem ser observadas em espécies de teleósteos aclimatadas à ambiente diluído por períodos prolongados, como alterações na composição das junções celulares e permeabilidade do epitélio (Chasiotis *et al.* 2012), no

tamanho e abertura apical das MRCs e na quantidade de MRCs (Fernandes *et al.* 1998; Hirai *et al.* 1999; Chang *et al.* 2001; Brix e Grosell 2011; Kang *et al.* 2012), incluindo eventos apoptóticos de substituição de tipos celulares em água doce e água do mar (Ching *et al.* 2013). Tais alterações podem representar modificações causadas pela exposição a variação de salinidade por períodos de dias ou semanas ao meio diluído. Uma hipótese alternativa para explicar o elevado grau de tolerância à salinidade por *C. parallelus* pode ser através de modificações no epitélio branquial e alterações na composição das junções celulares (Laverty e Skadhauge 2012). Paralelo a esse estudo, na espécie *C. parallelus* foi observado por microscopia eletrônica de varredura aumento do número e do tamanho da abertura apical das MRCs em peixes expostos em água doce por 10 dias quando comparados ao controle em água do mar (Dados não publicados). São conhecidas as diferenças entre as junções celulares dos epitélios de teleósteos dulcícolas e marinhos. O epitélio branquial de peixes marinhos apresenta junções do tipo *fracas*, enquanto o epitélio das brânquias de espécies dulcícolas exibem junções do tipo *fortes* (Evans *et al.* 2005; Laverty e Skadhauge 2012). Entre as muitas proteínas que compõem as junções celulares estão as ocludinas e claudinas, que ocorrem em abundância no tecido branquial e o registro de alteração na expressão de RNAm e abundância dessas proteínas quando em água doce e/ou deionizada, sugerem a contribuição destas nas junções do tipo forte dos epitélios branquiais de teleósteos dulcícolas e na tolerância à aclimação em condições hipo-osmóticas (Scott *et al.* 2004; Whitehead *et al.* 2011; Chasiotis *et al.* 2012).

O entendimento da história evolutiva do grupo a qual pertence, pode ajudar no entendimento do elevado grau de eurihalinidade da espécie *C. parallelus*. A espécie pertence à ordem dos Perciformes, a mais diversificada de todos os peixes, com origem primária marinha e apresentando algumas famílias reinvasando o ambiente dulcícola com sucesso (Myers 1949; Nelson 2006). As espécies da família *Centropominae* abrangem representantes marinhos (frequentemente de águas salobras) e de água doce (Nelson 2006). Assim como outros representantes dos Perciformes, o destaque para o elevado grau de eurihalinidade apresentado pelas espécies é associado a forte regulação do teor hídrico tecidual e das concentrações osmo-iônicas do extracelular (Freire *et al.* 2008b, Wosnick 2009; Gutierrez *et al.* 2013). Para *C. parallelus* uma espécie extremamente eurihalina que habita regiões estuarinas a ausência de alterações das proteínas NKA, NKCC e anidrase carbônica do epitélio branquial e da HSP70 muscular após a exposição a longo prazo em água doce, sugerem que outras alterações podem estar envolvidas na tolerância e sobrevivência exibida



pela espécie em meio diluído. Dentre tais alterações, modificações na permeabilidade do epitélio branquial, no aumento do tamanho e número das MRCs ou a modulação e a regulação de outras proteínas transportadoras (não avaliadas nesse estudo), podem estar contribuindo para manutenção do equilíbrio osmo-iônico do extracelular e sobrevivência em água doce.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, P.J.; Cech Jr, J.J.; Kültz, D. 2009. Mechanisms of seawater acclimation in a primitive, anadromous fish, the green sturgeon. *J Comp Physiol* 179B: 903-920.
- Berdan, E.L.; Fuller, R.C. 2012. Interspecific divergence of ionoregulatory physiology in killifish: insight into adaptation and speciation. *J Zool* 287: 283-291.
- Bockmann, F.A.; Guazzeli G.M. 2003. Heptapteridae. In: Reis, R.E., Kullander, S.O. and Ferraris, C.J. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre. Edipucrs, 406-431.
- Borba, M.R.; Seiffer, M.E.B.; Cerqueira, V.R. 1996. Utilizacion de cuatro dietas en la adaptacion de las larvas de robalo *Centropomus parallelus* al alimento inerte. In: CONGRESO LATINO AMERICANO DE ACUICULTURA, 9., Coquimbo, Chile, 1996. Comunicaciones Cortas. Coquimbo: Universidad Católica del Norte. p.272-5.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brix, K.V.; Grosell, M. 2011. Comparative characterization of Na<sup>+</sup> transport in *Cyprinodon variegatus variegatus* and *Cyprinodon variegatus hubbsi*: a model species complex for studying teleost invasion of freshwater. *J Exp Biol* 215: 1199-1209.
- Bui, P.; Bagherie-Lachidan, M.; Kelly, S.P. 2010. Cortisol differentially alters claudin isoforms in cultured puffer fish gill epithelia. *Mol Cell Endocrinol*, 317: 120-126.
- Bystriansky, J.S.; Richards, J.G.; Schulte, P.M.; Ballantyne, J.S. 2006. Reciprocal expression of gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit isoforms  $\alpha$ 1a and  $\alpha$ 1b during seawater acclimation of three salmonid fishes that vary in their salinity tolerance. *J Exp Biol* 209: 1848-1858.
- Carroll, R. L. 1988. Vertebrate Paleontology and Evolution. W. H. Freeman and Company, New York, 698pp.
- Catches, J.S.; Burns, J.M.; Edwards, S.L.; Claiborne, J.B. 2006. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, V-H<sup>+</sup>-ATPase and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase immunolocalization in a marine teleost (*Myoxocephalus octodecemspinosus*). *J Exp Biol* 209: 3440-3447.
- Chang, I.C.; Lee, T.H.; Yang, C.H.; Wei, Y.Y.; Chou, F.I.; Hwang, P.P. 2001. Morphology and function of gill mitochondria-rich cells in fish acclimated to different environments. *Physiol Biochem Zool* 74: 111-119.

- Chasiotis, H.; Kolosov, D.; Bui, P.; Kelly, S.P.; 2012. Tight junctions, tight junction proteins and paracellular permeability across the gill epithelium of fishes: A review. *Respir Physiol Neurobiol* 184: 269-281.
- Chavez, H. 1963. Contribucion al conocimiento de la biología de los robalos, chucumite y constantino (*Centropomus spp.*) del estado de Veracruz. *Ciência*, 22(3): 141-161.
- Ching, B.; Chen, X.L.; Yong, J.H.A.; Wilson, J.M.; Hiong, K.C.; Sim, E.W.L.; Wong, W.P.; Lam, S.H.; Chew, S.F.; Ip, Y.K. 2013. Increases in apoptosis, caspase activity and expression of *p53* and *bax*, and the transition between two types of mitochondrion-rich cells, in the gills of the climbing perch, *Anabas testudineus*, during a progressive acclimation from freshwater to seawater. *Front Physiol* 135(4): 1-21.
- Choe, K.P.; O'brien, S.; Evans, D.H.; Toop, T.; Edwards, S.L. 2004. Immunolocalization of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, Carbonic Anhydrase II, and Vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase in the Gills of Freshwater Adult Lampreys, *Geotria australis*. *J Exp Zool* 301A: 654-665.
- Choi, C.Y.; An, K.W. 2008. Cloning and expression of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and osmotic stress transcription factor 1 mRNA in black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* during osmotic stress. *Comp Biochem Physiol* 149B: 91-100.
- Cutler, C.P.; Cramb, G. 2002. Two isoforms of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  cotransporter are expressed in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Biochim Biophys Acta* 1566: 92-103.
- Dang, Z.; Balm, P.H.M.; Flick, G.; Bonga, S.E.W.; Lock, R.A.C. 2000. Cortisol increases  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase density in plasma membranes of gill chloride cells in the freshwater tilapia *Oreochromis mossambicus*. *J Exp Biol* 203: 2349-2355.
- Deane, E.E.; Kelly, S.P.; Luk, J.C.Y.; Woo, N.Y.S. 2002. Chronic Salinity Adaptation Modulates Hepatic Heat Shock Protein and Insulin-like Growth Factor I Expression in Black Sea Bream. *Mar Biotechnol* 4: 193-205.
- Duarte, R.M.; Ferreira, M.S.; Wood, C.M.; Val, A.L. 2013. Effect of low pH exposure on  $\text{Na}^+$  regulation in two cichlid fish species of the Amazon. *Comp Biochem Physiol* 166A: 441-448.
- Evans, D.H.; Piermarini, P.M.; Choe, K.P. 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol Rev* 85: 97-177.
- Evans, D.H. 2008. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R704-R713.
- Evans, D.H.; Claiborne, J.B. 2009. Osmotic and ionic regulation in fishes. In: D.H. Evans (ed.) *Osmotic and Ionic Regulation: Cells and Animals*, pp. 295-366. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Evans, D.H. 2011. Freshwater Fish Gill Ion Transport: August Krogh to morpholinos and microprobes. *Acta Physiol* 202: 349-359.

- Fernandes, M. N.; Perna, S. A.; Moron, S.E. 1998. Chloride cell apical surface changes in gill epithelia of the armoured catfish *Hypostomus plecostomus* during exposure to distilled water. *J Fish Biol* 52: 844-849.
- Flemmer, A.W.; Monette, M.Y.; Djurisic, M.; Dowd, B.; Darman, R.; Gimenez, I.; Forbush, B. 2010. Phosphorylation state of the  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$  cotransporter (NKCC1) in the gills of Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) during acclimation to water of varying salinity. *J Exp Biol* 213: 1558-1566.
- Freire, C.A.; Amado, E.M.; Souza, L.R.; Veiga, M.P.T.; Vitule, J.R.S.; Souza, M.M.; Prodocimo, V. 2008 (b). Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comp Biochem Physiol* 149A : 435-446.
- Froese, R.; Pauly, D. 2010. FishBase. World Wide Web electronic publication. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), version (01/2014).
- Galvez, F.; Reid, S.D.; Hawkings, G.; Goss, G.G. 2002. Isolation and characterization of mitochondria-rich cell types from the gill of freshwater rainbow trout. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 282: R658-R668.
- Gilmour, K.M.; Perry, S.F. 2009. Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish. *J Exp Biol* 212: 1647-1661.
- Gilmour, K.M.; Perry, S.F.; Esbaugh, A.J.; Genz, J.; Taylor, J.R.; Grosell, M. 2012. Compensatory regulation of acid-base balance during salinity transfer in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Comp Physiol* 182B: 259-274.
- Gonzalez, R.J. 2012. The physiology of hyper-salinity tolerance in teleost fish: a review. *J Comp Physiol* 182B: 321-329.
- Goss, G.G.; Perry, S.F.; Fryer, J.N.; Laurent, P. 1998. Gill Morphology and Acid-Base Regulation in Freshwater Fishes. *Comp Biochem Physiol* 119A: 107-115.
- Grosell, M.; Gilmour, K.M.; Perry, S.F. 2007. Intestinal carbonic anhydrase, bicarbonate- and proton carriers play a role in the acclimation of rainbow trout to seawater. *Am J Physiol* 293: R2099-R2111.
- Gutierrez, S.M.M.; Vitule, J.R.S.; Freire, C.A.; Prodocimo, V. 2013. Physiological tools to predict invasiveness and spread via estuarine bridges: tolerance of Brazilian native and worldwide introduced freshwater fishes to increased salinity. *Mar Fresh Research* 64:1-12.
- Havird, J.C.; Henry, R.P.; Wilson, A.E. 2013. Altered expression of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and other osmoregulatory genes in the gills of euryhaline animals in response to salinity transfer: A meta-analysis of 59 quantitative PCR studies over 10 years. *Comp Biochem Physiol* 8D: 131-140.
- Henry, R.P.; Swenson, E.R. 2000. The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate gas exchange organs. *Resp Physiol* 121: 1-12.

- Hirai, N.; Tagawa, M.; Kaneko, T.; Seikai, T.; Tanaka, M. (1999). Distributional changes in branchial chloride cells during freshwater adaptation in Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus*. *Zool Sci* 16: 43-49.
- Hirata, T.; Kaneko, T.; Ono, T.; Nakazato, T.; Furukawa, N.; Hasegawa, S. 2003. Mechanism of acid adaptation of a fish living in a pH3.5 lake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R1199–R1212.
- Hiroi, J.; McCormick, S.D. 2007. Variation in salinity tolerance, gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  cotransporter and mitochondria-rich cell distribution in three salmonids *Salvelinus namaycush*, *Salvelinus fontinalis* and *Salmo salar*. *J Exp Biol* 210: 1015-1024.
- Hiroi, J.; McCormick, S.D. 2012. New insights into gill ionocyte and ion transporter function in euryhaline and diadromous fish. *Resp Physiol Neurobiol* 184: 257-268.
- Hofmann, G.E. 2005. Patterns of Hsp gene expression in ectothermic marine organisms on small to large biogeographic scales. *Integrative Comp Biol* 45: 247-255.
- Huang, C.Y.; Chao, P.L.; Lin, H.C. 2010.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and vacuolar-type  $\text{H}^+$ -ATPase in the gills of the aquatic air-breathing fish *Trichogaster microlepis* in response to salinity variation. *Comp Biochem Physiol* 155A: 309-318.
- Hwang, P.P.; Lee, T.H. 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comp Biochem Physiol* 148A: 479-497.
- Hwang, P.P.; Lee, T.H.; Lin, L.Y. 2011. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol – Regulatory, Integrative and Comp Physiol* 301: R28–R47.
- Ito, Y.; Kobayashi, S.; Nakamura, N.; Miyagi, H.; Esaki, M.; Hoshijima, K.; Hirose, S. 2013. Close association of carbonic anhydrase (CA2a and CA15a),  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (Nhe3b), and ammonia transporter Rhcg1 in zebrafish ionocytes responsible for  $\text{Na}^+$  uptake. *Front Physiol* 4:49. doi: 10.3389/fphys.2013.00059.
- Kahle, K.T.; Rinehart, J.; Lifton, R.P. 2010. Phosphoregulation of the  $\text{Na-K-2Cl}$  and  $\text{K-Cl}$  cotransporters by the WNK kinases. *Biochim Biophys Acta* 1802: 1150-1158.
- Kang, C.K.; Tsai, H.J.; Liu, C.C.; Lee, T.H.; Hwang, P.P. 2010. Salinity-dependent expression of a  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  cotransporter in gills of the brackish medaka *Oryzias latipes*: A molecular correlate for hyposmoregulatory endurance. *Comp Biochem Physiol* 157A: 7-18.
- Kang, C.K.; Liu, F.C.; Chang, W.B.; Lee, T.H. 2012. Effects of low environmental salinity on the cellular profiles and expression of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{2Cl}^-$  cotransporter 1 of branchial mitochondrion-rich cells in the juvenile marine fish *Monodactylus argenteus*. *Fish Physiol Biochem* 38:665-678.
- Katoh, F.; Hyodo, S.; Kaneko, T. 2002. Vacuolar-type proton pump in the basolateral plasma membrane energizes ion uptake in branchial mitochondria-rich cells of killifish *Fundulus heteroclitus*, adapted to a low ion environment. *J Exp Biol* 206: 793-803.

- Kirschner, L.B. 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J Exp Biol* 207: 1439–1452.
- Kütz, D.; Somero, G.N. 1995. Osmotic and thermal effects on *in situ* ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys Mirabilis*. *J Exp Biol* 198: 1883-1894.
- Lavery, G.; Skadhauge, E. 2012. Adaptation of teleosts to very high salinity. *Comp Biochem Physiol* 163A: 1-6.
- Lin, Y.M.; Chen, C.N.; Lee, T.H. 2003. The expression of gill Na, K-ATPase in milkfish, *Chanos chanos*, acclimated to seawater, brackish water and fresh water. *Comp Biochem Physiol* 135A: 489-497.
- Lin, C.H.; Tsai, R.S.; Lee, T.H. 2004. Expression and distribution of Na, K-ATPase in gill and kidney of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*, in response to salinity challenge. *Comp Biochem Physiol A* 138:287–295.
- Loebmann, D.; Vieira, J.P. 2006. O impacto da pesca do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Perez-Farfante) (Decapoda, Penaeidae) nas assembleias de peixes e siris do Parque Nacional da Lagoa do Peixe, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 23: 1016–1028.
- Lorin-Nebel, C.; Boulo, V.; Bodinier, C.; Charmantier, G. 2006. The  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  cotransporter in the seabass *Dicentrarchus labrax* during ontogeny: involvement in osmoregulation. *J Exp Biol* 209: 4908–4922.
- Mackie, P.M.; Gharbi, K.; Ballantyne, J.S.; McCormick, S.D.; Wright, P.A. 2007.  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  cotransporter and CFTR gill expression after seawater transfer in smolts ( $0^+$ ) of different Atlantic salmon (*Salmo salar*) families. *Aquacult* 272: 625-635.
- Marshall, W.S; Grosell, M. 2005. Ion transport, osmoregulation and acid-base balance. In *Physiology of Fishes*. Vol. 3 (ed. D. Evans and J. B. Claiborne), pp. 177-230. Boca Raton: CRC Press.
- Marshall, W.S. 2011. Mechanosensitive signalling in fish gill and other ion transporting epithelia. *Acta Physiol* 202: 487-499.
- McCormick, S.D. 2001. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *Am. Zool.* 41: 781-794.
- McCormick, S.D.; Regish, A.M.; Christensen, A.K. 2009. Distinct freshwater and seawater isoforms of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in gill chloride cells of Atlantic salmon. *J Exp Biol* 212: 3994-4001.
- McNamara, J.C.; Faria, S.C. 2012. Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. *J Comp Physiol* 182B: 997-1014.
- Milani, P.C.C.; Fontoura, N.F. 2007. Diagnóstico da pesca artesanal na Lagoa do Casamento, sistema nordeste da Laguna dos Patos: Uma proposta de manejo. *Biociências*, 15: 82–125.
- Myers, G.S. 1949. Salt-tolerance of fresh-water fish groups in relation to zoogeographical problems. *Bijdragen tot de Dierkunde* 28: 315–322.

- Nelson, J.S. 2006. Fishes of the world. 4th edition. New York: John Wiley and Sons. 601pp.
- Odum, E.P. 1988. *Ecologia*, 2nd edn. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro.
- Pelis, R.M.; Zydlewski, J.; McCormick, S.D. 2001. Gill  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  cotransporter abundance and location in Atlantic salmon: effects of seawater and smolting. *Am J Physiol* 280: R1844–R1852.
- Perry, S. F.; Gilmour, K. M. 2006. Acid-base balance and  $\text{CO}_2$  excretion in fish: unanswered questions and emerging models. *Respir Physiol Neurobiol* 154: 199-215.
- Prodocimo, V.; Freire, C.A. 2001. Ionic regulation in aglomerular tropical estuarine pufferfishes submitted to sea water dilution. *J Exp Mar Biol Ecol* 262: 243-253.
- Prodocimo, V.; Freire, C.A. 2004. Estuarine pufferfishes (*Sphoeroides testudineus* and *S. greeleyi*) submitted to seawater dilution during ebb tide: a field experiment. *Mar Fresh Behav Physiol* 37: 1-5.
- Prodocimo, V.; Freire, C.A. 2006. The  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  cotransporter of estuarine pufferfishes (*Sphoeroides testudines* and *S. greeleyi*) in hypo- and hyper-regulation of plasma osmolality. *Comp Biochem Physiol* 142C: 347-355.
- Prodocimo, V.; Galvez, F.; Freire, C.A.; Wood, C.M. 2007. Unidirectional  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes in two euryhaline teleost fishes, *Fundulus heteroclitus* and *Oncorhynchus mykiss*, acutely submitted to a progressive salinity increase. *J Comp Physiol* 177B: 519-528.
- Prodocimo, V.; Souza, C.F.; Pessini, C.; Fernandes, L.C.; Freire, C.A. 2008. Metabolic substrates are not mobilized from the osmoregulatory organs (gills and kidney) of the estuarine pufferfishes *Sphoeroides greeleyi* and *S. testudineus* upon shortterm salinity reduction. *Neotropical Ichthyology*, 6(4): 613-620.
- Rahim, S.M.; Delaunoy, J.P.; Laurent, P. 1988. Identification and immunocytochemical localization of two different carbonic anhydrase isoenzymes in teleostean fish erythrocytes and gill epithelia. *Histochem* 89: 451-459.
- Reinhart, A.; Reithmeier, F. 2001. A membrane metabolon linking carbonic anhydrase with chloride/bicarbonate anion exchangers. *Blood Cell Mol Dis* 27: 85–89.
- Richards, J.G.; Semple, J.W.; Bystriansky, J.S.; Schulte, P.M. 2003.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$ -isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer. *J Exp Biol* 206: 4475-4486.
- Rivas, L.R. 1986. Sistematic Review of the Perciform fishes of the genus *Centropomus*. *Copeia*, 3, 579-611.
- Sáez, A.G.; Lozano, E.; Zaldívar-Riverón, A. 2009. Evolutionary history of Na,K-ATPases and their osmoregulatory role. *Genetica* 136: 479–490.
- Saoud, I.P.; Kreydiyyeh, S.; Chalfoun, A.; Fakih, M. 2007. Influence of salinity on survival, growth, plasma osmolality and gill  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  activity in the rabbitfish *Siganus rivulatus*. *J Exp Mar Biol Ecol* 348: 183-190.

- Sattin, G.; Mager, E.M.; Beltramini, M.; Grosell, M. 2010. Cytosolic carbonic anhydrase in the Gulf toadfish is important for tolerance to hypersalinity. *Comp Biochem Physiol.* 156A: 169-175.
- Scott, G.R.; Rogers, J.T.; Richards, J.G.; Wood, C.M.; Schulte, P.M. 2004. Intraspecific divergence of ionoregulatory physiology in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*: possible mechanisms of freshwater adaptation. *J Exp Biol* 207: 3399-3410.
- Scott, G. R., Claiborne, J. B., Edwards, S. L., Schulte, P. M. and Wood, C. M. 2005. Gene expression after freshwater transfer in gills and opercular epithelia of killifish: insight into divergent mechanisms of ion transport. *J Exp Biol* 208: 2719-2729.
- Scott, G.R.; Schulte, P.M. 2005. Intraspecific variation in gene expression after seawater transfer in gills of the euryhaline killifish *Fundulus heteroclitus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 141: 176–182.
- Scott, G.R.; Baker, D.W.; Schulte, P.M.; Wood, C.M. 2008. Physiological and molecular mechanisms of osmoregulatory plasticity in killifish after seawater transfer. *J Exp Biol* 211: 2450-2459.
- Sender, S.; Böttcher, K.; Cetin, Y.; Gros, G. 1999. Carbonic Anhydrase in the Gills of Seawater-and Freshwater-acclimated Flounders *Platichthys flesus*: Purification, Characterization, and Immunohistochemical Localization. *J Histochem Cytochem* 47: 43-50.
- Souza-Bastos, L.; Freire, C.A. 2009. The handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 289: 167–174.
- Sterling, D.; Reithmeier, R.; Casey, J. 2001. A transport metabolon. *J Biol Chem* 276: 47886–47894.
- Tang, C.H.; Lee, T.H. 2007. The effect of environmental salinity on the protein expression of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  cotransporter, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, anion exchanger 1, and chloride channel 3 in gills of a euryhaline teleost, *Tetraodon nigroviridis*. *Comp Biochem Physiol* 147A: 521-528.
- Tang, C.H.; Tzeng, C.S.; Hwang, L.Y.; Lee, T.H. 2009. Constant Muscle Water Content and Renal HSP90 Expression Reflect Osmotic Homeostasis in Euryhaline Teleosts Acclimated to Different Environmental Salinities. *Zool Stud* 48(4): 435-441.
- Tang, C.H.; Lee, T.H. 2013. Freshwater Acclimation Induces Stress Responses and Expression of Branchial  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and Proliferating Cell Nuclear Antigen in *Takifugu niphobles*. *J Exp Zool* 319A: 409-421.
- Tipsmark, C.K.; Madsen, S.S.; Seidelin, M.; Christensen, A.S.; Cutler, C.P.; Cramb, G. 2002. Dynamics of  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  cotransporter and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase expression in the branchial epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Exp Zool* 293: 106–118.
- Tomanek, L. 2010. Variation in the heat shock response and its implication for predicting the effect of global climate change on species' biogeographical distribution ranges and metabolic costs. *J Exp Biol* 213: 971-979.

- Tresguerres, M.; Parks, S.K.; Goss, G.G. 2006. V-H<sup>+</sup>-ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and NHE2 immunoreactivity in the gill epithelium of the Pacific hagfish (*Epatretus stoutii*). *Comp Biochem Physiol* 145A: 312-321.
- Tringali, M.D.; Bert, T.M.; Seyoum, S.; Bermingham, E.; Bartolacci, D. 1999. Molecular phylogenetics and ecological diversification of the transisthmian fish genus *Centropomus* (Perciformes: Centropomidae). *Mol Phylogen Evol* 13: 193–207.
- Tsuzuki, M.Y.; Cerqueira, V.R.; Teles, A.; Doneda, S. 2007. Salinity Tolerance of Laboratory Reared Juveniles of The Fat Snook *Centropomus parallelus*. *Brazilian journal of Oceanography* 55(1), 1-5.
- Vargas, R.; Bessonart, M. 2007. Lipid body composition of black catfish, *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae), of two populations adapted to different environmental conditions. *Boletim do Instituto da Pesca* 33, 105.
- Vitale, A.M.; Monserrat, J.M.; Castilho, P.; Rodriguez, E.M. 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp Biochem Physiol*, v. 122C, p. 121-129.
- Vitule, J.R.S. 2007. Distribuição, abundância e estrutura populacional de peixes introduzidos no rio Guaraguaçu, Paranaguá, Paraná, Brasil. Tese de Doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas área de concentração Zoologia da UFPR. Curitiba. 139p.
- Vitule, J.R.S.; Gazola da Silva, F.F.; Bornatowski, H.; Abilhoa, V. 2013. Feeding ecology of fish in a coastal river of the Atlantic Rain Forest. *Environ Biol Fishes* 96: 1029–1044. doi:10.1007/ 10S10641-012-0101-7.
- Whitehead, A.; Roach, J.L.; Zhang, S.; Galvez, F. 2011. Genomic mechanisms of evolved physiological plasticity in killifish distributed along an environmental salinity gradient. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 6193–6198.
- Wilson, J.M.; Laurent, P.; Tufts, B.L.; Benos, D.J.; Donowitz, M.; Vogl, A.W.; Randall, D.J. 2000 (a). NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: an immunological approach to ion-transport protein localization. *J Exp Biol* 203: 2279–2296.
- Wilson, J.M.; Randall, D.J.; Donowitz, M. Vogl, A.W.; IP, A.K.Y. 2000 (b). Immunolocalization of ion-transport proteins to branchial epithelium mitochondria-rich cells in the mudskipper (*Periophthalmodon schlosseri*). *J Exp Biol* 203: 2297-2310.
- Wilson, J.M.; Laurent, P. 2002. Fish Gill Morphology: Inside Out. *J Exp Zool* 293: 192-213.
- Wosnick, N. 2009. Plasticidade osmorregulatória em *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) – Robalo-peva. Monografia apresentada para conclusão do curso de Ciências Biológicas da UFPR. Curitiba. 39p.
- Yamashita, M.; Yabu, T.; Ojima, N. 2010. Stress protein HSP70 in Fish. *Aqua-BioScience Monographs* 3: 111-141.



- Yang, W.K.; Hseu, J.R.; Tang, C.H.; Chung, M.J.; Wu, S.M.; Lee, T.H. 2009.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase expression in gills of the euryhaline sailfin molly, *Poecilia latipinna*, is altered in response to salinity challenge. J Exp Mar Biol Ecol 375: 41-50.
- Yang, W.K.; Kang, C.K.; Chen, T.Y.; Chang, W.B.; Lee, T.H. 2011. Salinity-dependent expression of the branchial  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  cotransporter and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in the sailfin molly correlates with hypoosmoregulatory endurance. J Comp Physiol 181B: 953-964.
- Young, J.L.; Bornik, Z.B.; Marcotte, M.L.; Charlie, K.N.; Wagner, G.N.; Hinch, S.G.; Cooke, S.J. 2006. Integrating physiology and life history to improve fisheries management and conservation. Fish Fisheries 7: 262-283.

**Capítulo 2: Avaliação de proteínas osmorregulatórias branquiais do camarão dulcícola *Macrobrachium acanthurus* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) exposto a choque hiper-osmótico**

## 1. INTRODUÇÃO

O clado *Crustacea* reúne representantes de ambientes diversificados, sendo eles aquáticos ou terrestres, marinhos ou dulcícolas. As espécies apresentam diferentes estratégias osmorregulatórias, como osmoconformadoras ou osmorreguladoras, hiper e/ou hiporreguladoras, podendo ser estenohalinas ou eurihalinas (Péqueux 1995; Freire *et al.* 2008a; McNamara e Faria 2012). As espécies hiper-reguladoras podem ainda ser classificadas quanto ao seu grau de tolerância a meio diluído ou a água doce. Espécies hiper-reguladoras que exibem capacidade limitada de regulação osmo-iônica em baixas salinidades ou durante longo tempo de exposição podem ser classificadas hiper-reguladoras *fracas*. As que apresentam elevada tolerância ao meio diluído por períodos mais prolongados, incluindo a água doce, são hiper-reguladoras *fortes* (Péqueux 1995; Kirschner 2004).

Se tratando de espécies dulcícolas, como espécies de camarões representantes do gênero *Macrobrachium* (família Palaemonidae), a capacidade hiper-osmoregulatória requer mecanismos ativos para absorção de sal através de células branquiais conhecidas por ionócitos (parte superior da Fig. 1) (McNamara e Faria 2012). Os camarões palemonídeos constituem um dos mais diversos e amplos táxons que tem invadido o ambiente dulcícola a partir de um ancestral em água marinha (Murphy e Austin 2005; Augusto *et al.* 2009), com variadas habilidades osmorregulatórias frente aos ambientes com diferentes salinidades (Freire *et al.* 2003; Freire *et al.* 2008b).

As brânquias e os órgãos excretores, como a glândula antenal e glândula maxilar, exibem importante função na regulação osmótica e iônica (Freire *et al.* 2008a). O epitélio branquial dos camarões palemonídeos é composto por células pilares, as quais apresentam extensas franjas na porção apical. A porção basolateral dessas células está em contato com as células do septo intralamelar que divide no plano horizontal a lamela em dois compartimentos simétricos (Freire *et al.* 2008a; Belli *et al.* 2009). Os transportadores de membrana expressos basolateralmente,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (NKA), canais de  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , juntamente com canais para  $\text{Na}^+$ , a  $\text{H}^+$ -ATPase e trocadores  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  localizados na membrana apical, caracterizam um epitélio de absorção em hiper-reguladores *fortes*. Ainda, íons  $\text{H}^+$  e  $\text{HCO}_3^-$  disponibilizados através da reação catalisada pela enzima intracelular anidrase carbônica são utilizados pelos trocadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (Fig. 1) (Kirschner 2004; Freire *et al.* 2008a; McNamara e Faria 2012).

A localização basolateral e a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase gera o gradiente eletroquímico para a absorção de  $\text{Na}^+$  em meio diluído nos crustáceos hiper-osmorreguladores

(Péqueux 1995; Lucu e Towle 2003; França *et al.* 2013), da mesma forma que direciona a secreção ativa de  $\text{Na}^+$  em meio concentrado nos hipo-osmorreguladores (Martinez *et al.* 1998) (Fig. 1). A regulação da expressão gênica da NKA em resposta a salinidade também é descrita em camarões palemonídeos. A atividade da NKA branquial no camarão dulcícola *Macrobrachium olfersii* foi reduzida em 35% após 20 dias de exposição à salinidade 20‰ e 28‰ quando comparado aos valores obtidos no grupo controle em água doce (Lima *et al.* 1997). Na espécie *Macrobrachium amazonicum* também houve diminuição da atividade da NKA em condição de salinidade 25‰ por 5h, apresentando recuperação em 24h e retorno aos valores próximos ao controle após 5 dias. Esse resultado foi acompanhado de um aumento de 6,5 vezes no valor inicial encontrado na expressão de RNAm da subunidade  $\alpha$  da NKA em 1h, diminuindo de 3 a 4 vezes após 24 horas e após 10 dias diminuiu para 1.5 vezes do valor inicial (Faleiros *et al.* 2010). Outro estudo demonstrou diminuição da abundância relativa da NKA branquial em *M. amazonicum* em resposta a aclimação a salinidade de 21‰ por 10 dias (Belli *et al.* 2009).

Somado ao gradiente eletroquímico gerado pela NKA, o bombeamento de íons  $\text{H}^+$  pela  $\text{H}^+$ -ATPase apical favorece a absorção de NaCl em ambiente diluído ou em água doce. A consequente hiperpolarização da membrana apical favorece a entrada de  $\text{Na}^+$  (também apical) via canais. A participação da  $\text{H}^+$ -ATPase para a absorção de sal é corroborada pela diminuição na atividade e na expressão de RNAm da  $\text{H}^+$ -ATPase encontrada na espécie *M. amazonicum* aclimatada a salinidade 21‰ (Faleiros *et al.* 2010). A enzima anidrase carbônica, também relevante em ambiente dulcícola, catalisa a reação de hidratação do  $\text{CO}_2$  disponibilizando íons  $\text{H}^+$  e  $\text{HCO}_3^-$ , os quais são utilizados pela  $\text{H}^+$ -ATPase e pelo trocador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  apical para absorção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , respectivamente. Em alguns crustáceos marinhos expostos a diluição de salinidade, a enzima Anidrase Carbônica está bem caracterizada quanto ao seu papel no mecanismo de absorção de sal em ambiente dulcícola, com aumento da atividade e expressão após transferência para condições de água mais diluída (Henry 2001; Henry *et al.* 2003; Serrano *et al.* 2007; Serrano e Henry 2008).

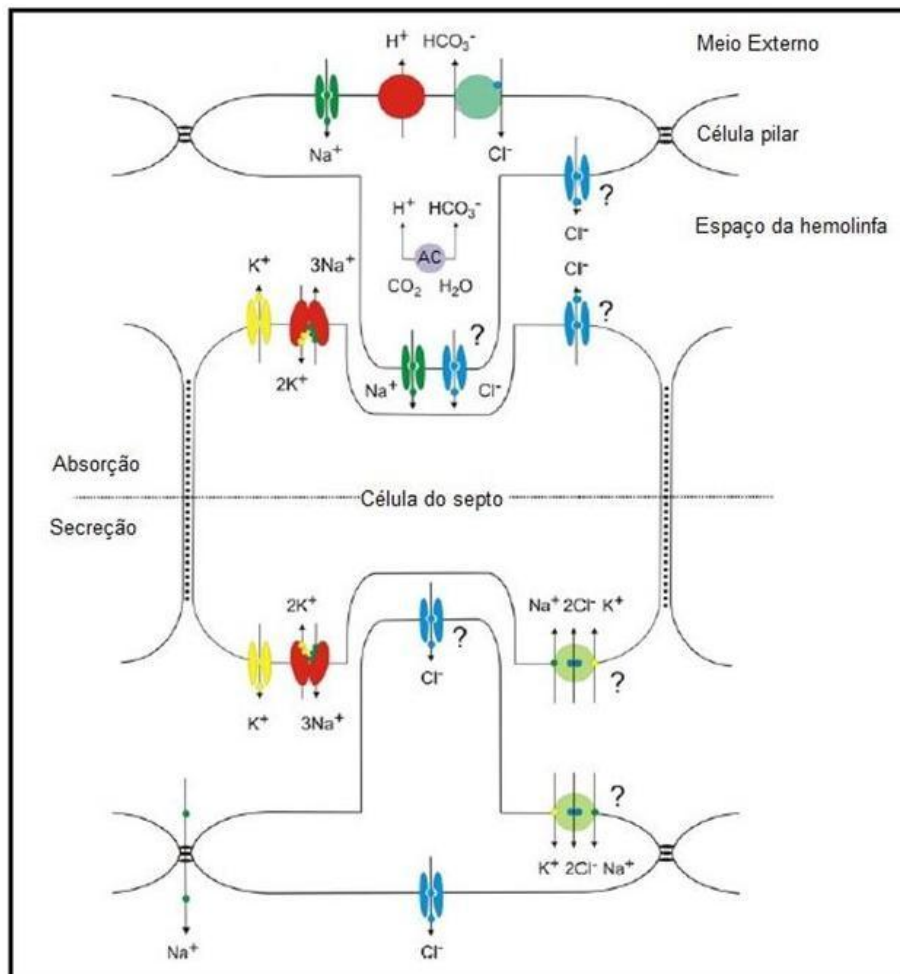
Apesar do esforço em elucidar os processos de transporte iônico em meios hipo- ou hiper-osmóticos, os mecanismos de secreção de sal não estão claros em crustáceos, tanto para espécies restritas a ambientes salinos quanto para espécies de água doce que transitam entre habitats dulcícolas e com salinidade mais elevada (Freire *et al.* 2008a; McNamara e Faria 2012). Tal mecanismo é bem conhecido em peixes teleósteos (Marshall e Grosell 2005; Evans

*et al.* 2005; Gonzalez *et al.* 2012) (Fig. 2; Cap. 1) e parece ser recorrente em invertebrados e vertebrados de modo geral (revisado em McNamara e Faria 2012).

A espécie de camarão dulcícola *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Palaemonidae, Decapoda) (Fig. 2), também conhecida como camarão-canela, distribui-se desde o estado da Carolina do Norte (EUA) até o estado do Rio Grande do Sul (Brasil). *M. acanthurus* apresenta hábito diádromo, ou seja, migra para regiões mais salobras para se reproduzir. Para completo desenvolvimento larval é necessário estar em águas salobras, como por exemplos os estuários (revisado em Almeida *et al.* 2008). Estudos de identificação de 11 estágios larvais utilizando salinidade 16‰ corroboram com a necessidade de ambiente salobro para completar o ciclo de vida (Quadros 2004). A espécie apresenta grande porte, altas taxas de fertilidade e fecundidade, fácil manutenção e reprodução em cativeiro, por isso é considerada potencialmente viável para o cultivo em escala comercial (Choudhury 1970; New 1995).

A avaliação da habilidade osmorregulatória de *M. acanthurus* revelou que a espécie apresenta elevada capacidade osmorregulatória frente a salinidades mais elevadas. Quando transferido de maneira abrupta da salinidade 0‰ para 20‰ (Lara 2003) e para 25‰ (Dados não publicados) alterações observadas nas primeiras horas de exposição nas concentrações osmótica e dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  plasmáticas foram reduzidas para próximo ao valor encontrado no grupo controle após 120h. No entanto, quando essa espécie foi exposta a salinidade 30‰, os indivíduos perderam sua capacidade osmorregulatória a partir de 2 horas (Foster *et al.* 2010).

Desta forma, o objetivo deste capítulo foi a avaliação da atividade e expressão da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e  $\text{H}^+$ -ATPase e da enzima anidrase carbônica nas brânquias do camarão dulcícola *Macrobrachium acanthurus* frente a aumento de salinidade (25‰) durante 24 horas, utilizando medida de atividade enzimática para as ATPases e localização das três proteínas transportadoras por imunofluorescência. Contribuindo dessa forma para a teorização dos modelos hipotéticos de transporte e elucidação dos mecanismos osmorregulatórios requeridos durante a transferência dos espécimes da água doce para meio salobro.



**Figura 1.** Modelo hipotético da disposição dos transportadores iônicos nas células epiteliais branquiais de camarões palemonídeos de água doce em condições hipo-/hiper-osmóticas. Modificado de McNamara e Faria 2012.



**Figura 2.** Exemplar adulto de *Macrobrachium acanthurus*. (Foto: Silvia Gutierre)

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Coleta da espécie e protocolo experimental

Indivíduos da espécie *Macrobrachium acanthurus* foram coletados junto aos pescadores no Município de Pontal do Paraná, Paraná e transportados em galões de 30 litros, com aeração constante, ao Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação, Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os camarões foram aclimatados durante 5 dias em aquário estoque contendo água doce, com aeração constante e temperatura de ~20°C, e alimentados a cada 48 horas com carne bovina moída.

No período experimental os animais ( $5,2 \pm 0,62$ cm) foram mantidos individualmente em potes plásticos de 0,5 litros com aeração constante. Os grupos controle e experimental foram expostos durante 24 horas em água doce (n=5) e em a água 25‰ (n=5), respectivamente. Esse desenho experimental foi realizado em duplicata para a obtenção de quantidade suficiente de tecido branquial para realização das análises. Após 24 h, os animais foram anestesiados em gelo por 5 minutos, medidos e então foi seccionado o cordão nervoso central para dissecação do tecido branquial. Foram retiradas as brânquias do lado direito para técnica de imunofluorescência e todas as outras utilizadas para realização dos ensaios enzimáticos.

### 2.2. Atividade da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e $\text{H}^+$ -ATPase

Para determinação da atividade das enzimas  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e  $\text{H}^+$ -ATPase foi utilizado o protocolo estabelecido por Kültz e Somero (1995) modificado por Duarte *et al.* (2013). O ensaio se baseia na reação de redução do NADH pela reação enzimática acoplada ao mecanismo de hidrólise do ATP. Uma fração de tecido branquial (1 parte de tecido em 10 de tampão) de *M. acanthurus* foi homogeneizada em tampão SEID (Sacarose 150mM, Imidazol 50mM, EDTA 10mM, ácido deoxicólico 0,5%, pH 7,5). O homogeneizado foi centrifugado por 5 minutos a 2.000 xg a 4°C e retirado o sobrenadante. O total de 5µl do sobrenadante foi adicionado, juntamente com 200 µl de solução de reação (Imidazol 30mM, NaCl 45mM, KCl 15mM,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  3mM, KCN 0,4mM, 1.0mM de ATP, 0,2mM de NADH, 3IU/ml de PK, 2IU/ml de LDH, 0,1mM de Frutose-1,6-Difosfato e 2mM de PEP), a cada poço de uma única linha da microplaca (12 poços), totalizando um total de 8 amostras por placa. As amostras foram divididas em quadruplicatas, sendo nas 4 primeiras réplicas adicionado somente a solução de reação sem inibidores. Nas outras 4 foi adicionada solução

de reação contendo 2mM de oobaína (inibidor da NKA) e nas 4 últimas réplicas foi adicionada a solução contendo 2mM de N-etil-etanolamina (inibidor da H<sup>+</sup>-ATPase). A leitura foi realizada em absorbância de 370nm (Tecan Infinite M200, Áustria) a temperatura ambiente. A inclinação da reta de regressão linear obtida pela taxa de oxidação do NADH pelo tempo foi usada para determinação da atividade da NKA e HA. A unidade obtida para ambas as enzimas foi de  $\mu\text{mol h}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ . Para quantificação das proteínas totais no sobrenadante do tecido branquial e renal foi determinado pelo método de Bradford (1976).

$$\text{Atividade} = \{(\text{inclinação} * 56,6) / ([\text{Proteínas}] * 0,005) * 60 / 1000\} * -1$$

### 2.3. *Imunofluorescência*

As brânquias foram fixadas em paraformaldeído 2% em tampão fosfato (PBS) por 3 horas. Em seguida, o material foi incubado em PBS com sacarose 5% por 2 horas e em PBS com sacarose 15% *overnight* a 4°C para preservação do material durante o congelamento. As brânquias foram então incluídas em meio OCT (solução crioprotetora de seccionamento de temperatura ótima, Tissue-Tek) e imediatamente congeladas a -20°C com posterior armazenamento em freezer -80°C. Os blocos de OCT contendo as lamelas branquiais foram cortados em criostato (Criostato leica® CM1850) na espessura de 10 a 12  $\mu\text{m}$  e os cortes foram colocados em lâminas de vidro preparadas em solução de 3-Aminopropil trietoxissilano para adesão dos cortes.

Para início do protocolo de marcação os cortes foram lavados com PBS e PBS com glicina 0,1 M para bloqueio das cadeias aldeídicas livres. O material foi então bloqueado em PBS com soro albumina bovina (BSA) a 1% e incubado em câmara úmida a 4°C *overnight* com anticorpo primário anti-Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (subunidade  $\alpha 5$ , anti camundongo, Banco de Estudos de Desenvolvimento de Híbrido, Departamento de Ciências biológicas), anti anidrase carbônica (CAII IgG, produzido em coelho, Abcam®, Cambridge, MA) e anti V-ATPase (B1/2 H-180, produzido em coelho, Santa Cruz Biotechnology®). Todos os anticorpos foram diluídos na proporção 1:100 em PBS com BSA 0,1%. Após a incubação, os cortes foram lavados em PBS, bloqueados com BSA 1% e então incubados por 2 horas, em câmara úmida escura a temperatura ambiente, com anticorpo secundário anti-camundongo IgG produzido em cabra e conjugado com o fluorocromo fluoresceína (FITC) (Pierce, EUA) e com anticorpo secundário anti-coelho IgG produzido cabra e conjugado com o fluorocromo rodamina (TRITC) (Pierce, EUA), diluídos 1:100 em PBS com BSA 0,1%. Para confirmação da efetiva marcação entre o anticorpo primário e as proteínas de interesse, foram feitas



incubações somente com o anticorpo secundário, resultando em um controle negativo para cada condição experimental. A seguir, o material foi lavado em PBS para montagem com Fluormount (Meio de montagem aquoso, Sigma-Aldrich) e lamínulas, sempre protegidos da luz. As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio de epifluorescência (Zeiss), acoplado ao software para foto-documentação Leica Application Suite (Versão 3.1.0).

As lâminas foram analisadas e quantificadas a partir das fotos digitais das lamelas branquiais por meio do programa ImageJ.

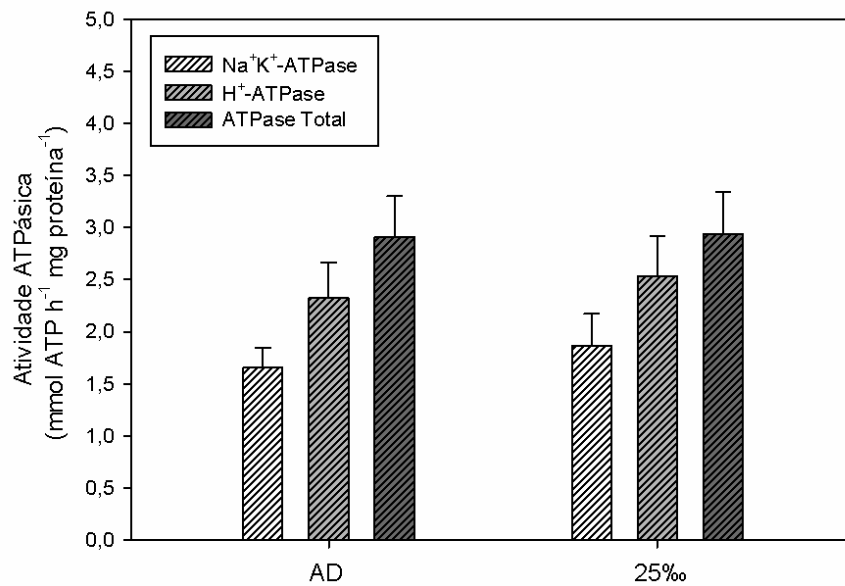
#### **2.4.     *Análise estatística***

O tratamento estatístico se deu utilizando o test-*t* de student para comparação dos fatores salinidades para cada espécie (água doce e salinidade 15‰ em *R. quelen*; água do mar e água doce em *C. parallelus*). Os resultados foram expressos na forma de média±erro padrão da média com nível de significância (P) <0,05.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Atividade da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e $\text{H}^+$ -ATPase

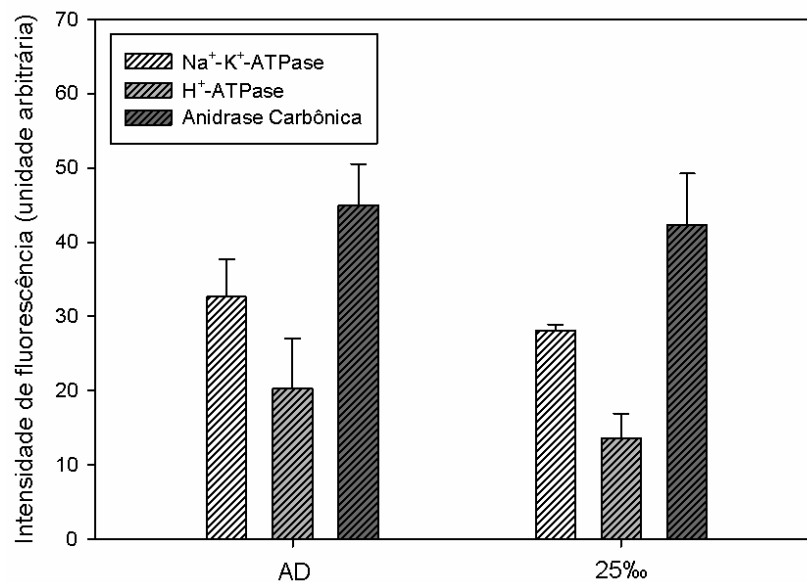
Não houve diferença na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e  $\text{H}^+$ -ATPase branquial entre os camarões expostos na água doce (controle) e na salinidade 25‰ por 24 horas (Fig. 3). A atividade ATPásica total branquial também não diferiu entre o grupo controle ( $2,91 \pm 0,4$ ) e experimental ( $2,94 \pm 0,4$ ).



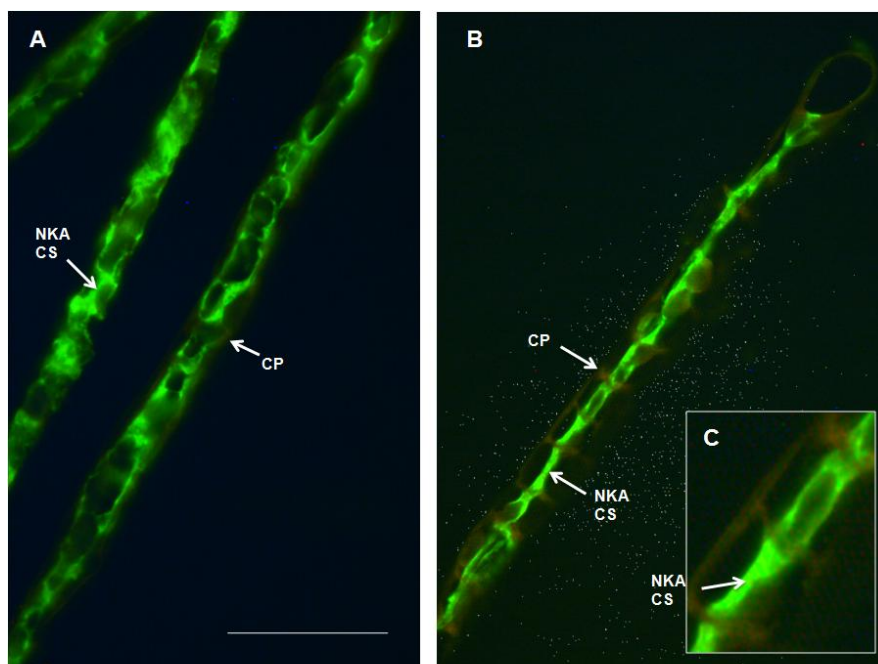
**Figura 3.** Atividade das enzimas  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e  $\text{H}^+$ -ATPase, e atividade ATPásica total branquial ( $\text{mmol ATP h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ ) (média±erro padrão) de indivíduos de *M. acanthurus* expostos por 24 horas em condição controle em água doce (AD) ( $n=5$ ) e à salinidade de 25‰ ( $n=5$ ). Não houve diferença entre os grupos.

### 3.2. Expressão e localização por imunofluorescência

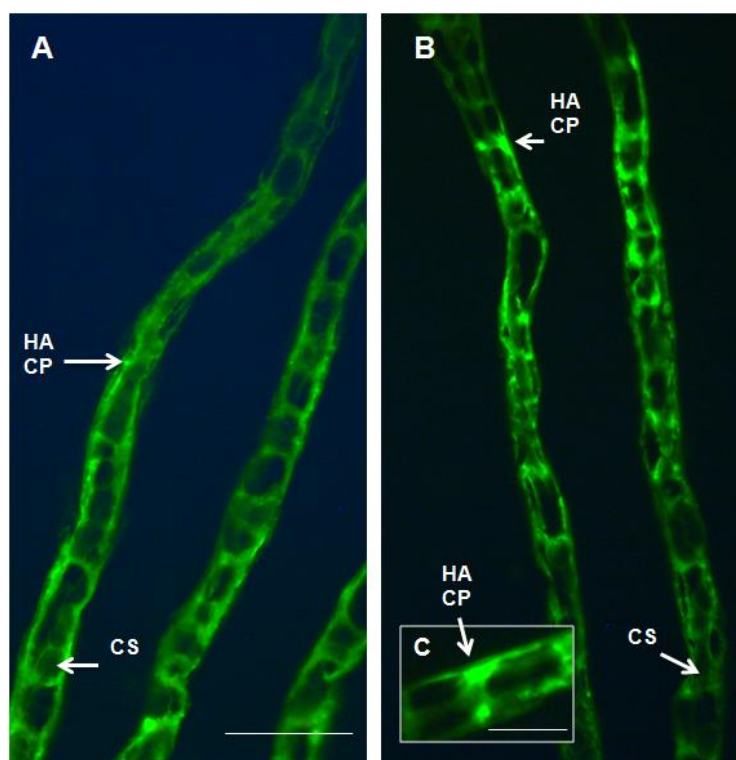
A expressão das proteínas branquiais  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (NKA),  $\text{H}^+$ -ATPase e anidrase carbônica de *M. acanthurus* detectada pela técnica de imunofluorescência não indicaram diferença na intensidade de fluorescência nos indivíduos expostos a salinidade 25‰ durante 24 horas quando comparados aos controle em água doce (Fig. 4). A localização da NKA e  $\text{H}^+$ -ATPase indica uma maior abundância da NKA nas células do septo (Fig. 5), e da  $\text{H}^+$ -ATPase nas células pilares (Fig. 6). Não houve mudança no padrão da localização das ATPases frente ao aumento de salinidade em 24 horas. A enzima anidrase carbônica apresentou marcação por todo o tecido, sendo mais evidente nas células pilares (Fig. 7).



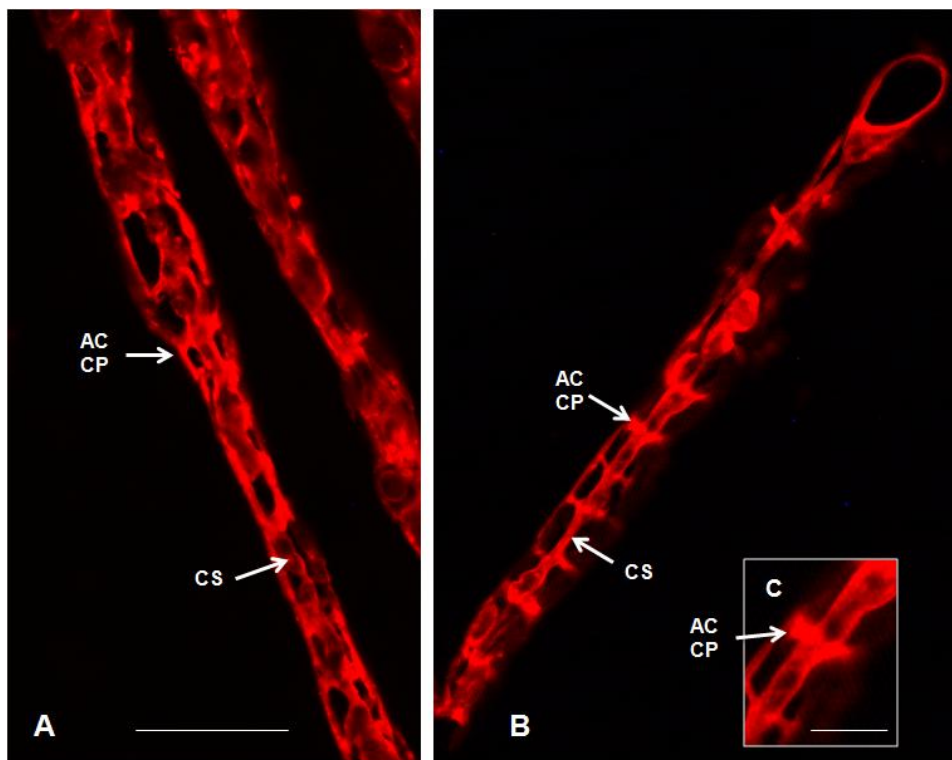
**Figura 15.** Intensidade de fluorescência (em unidade arbitrária) (média±erro padrão) das  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase,  $\text{H}^+$ -ATPase e da enzima intracelular anidrase carbônica do tecido branquial de *M. acanthurus* expostos por 24 horas em condição controle em água doce (AD) (n=5) e à salinidade de 25‰ (n=5). Não houve diferença entre os grupos.



**Figura 5.** Imunofluorescência da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (NKA –  $\alpha 5$ ) no epitélio branquial de *M. acanthurus* exposto por 24 horas a água doce (controle) (n=5) (A) e à salinidade 25‰ (n=5) (B). As setas brancas indicam o sinal da NKA nas células do septo (CS) e a ausência de marcação nas células pilares (CP). Barra de escala (A-B): 50  $\mu\text{m}$ . Imunomarcção da NKA nas células do septo (C). Barra de escala (C): 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 16.** Imunofluorescência da  $\text{H}^+$ -ATPase (HA) no epitélio branquial de *M. acanthurus* exposto por 24 horas a água doce (controle) (n=5) (A) e à salinidade 25‰ (n=5) (B). As setas brancas indicam o sinal da HA nas células pilares (CP) e a ausência de marcação nas células do septo (CS). Barra da escala (A-B): 50  $\mu\text{m}$ . Imunomarcção da HA nas células pilares (C). Barra de escala (C): 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 17.** Imunofluorescência da anidrase carbônica (AC) no epitélio branquial de *M. acanthurus* exposto por 24 horas a água doce (controle) (n=5) (A) e à salinidade 25‰ (n=5) (B). As setas brancas indicam o sinal da AC nas células do septo (CS) e nas células pilares (CP). Barra de escala (A-B): 50  $\mu$ m. Indicação da abundância de anidrase carbônica nas células pilares (C). Barra de escala (C): 10 $\mu$ m.

#### 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A espécie de camarão dulcícola *M. acanthurus* não demonstrou alteração na atividade da NKA e  $H^+$ -ATPase e da atividade ATPásica total entre os animais controle (água doce) e os expostos por 24 horas em salinidade 25‰ (Fig. 3) Da mesma forma que a atividade, não houve alteração na abundância relativa branquial da NKA e  $H^+$ -ATPase e da enzima intracelular anidrase carbônica entre os animais de água doce e os expostos a salinidade 25‰ (Fig. 4). A NKA foi localizada nas células que compõem o septo branquial (Fig. 5). A abundância da  $H^+$ -ATPase foi significativa nas células pilares (Fig. 6). A enzima anidrase carbônica foi imunolocalizada em ambas as células, no entanto houve predominância da marcação nas células pilares (Fig. 7).

A técnica de imunofluorescência é pouco utilizada tanto na investigação de modelos de transporte iônico branquial em camarões palemonídeos quanto no entendimento sobre as alterações no conjunto de transportadores iônicos branquiais em resposta a transferência entre meios osmoticamente distintos. O único registro da caracterização da subunidade  $\alpha 5$  da NKA

nas células do septo, foi na espécie *Macrobrachium rosenbergii* em água doce (França *et al.* 2013). Também houve marcação da NKA nos tecidos osmorregulatórios em diferentes estágios de desenvolvimento de duas populações do camarão *Macrobrachium amazonicum* exposto a diferentes salinidades (Boudour-Bouchecker *et al.* 2013). No caranguejo eurihalino marinho *Eriocheir sinensis* adaptado a água doce, a  $H^+$ -ATPase foi imunolocalizada nas células pilares das brânquias (Putzenlechner 1994; revisado em Freire *et al.* 2008a). Quando se trata da avaliação de possíveis alterações no conjunto de transportadores que compõem as células do epitélio branquial de palemonídeos frente à transferência entre meio hipo e hiper-osmótico, estudos são ausentes. Apesar de escassos, esses estudos de imunomarcação, corroboram os resultados apontados nesse estudo.

Os resultados inéditos apresentados sobre a localização das proteínas participantes do mecanismo de transporte transepitelial nas brânquias de *M. acanthurus* suportam modelos hipotéticos de transporte iônico branquial de camarões palemonídeos, proposto recentemente (Fig. 1) (McNamara e Faria 2012). A presença da NKA branquial, abundante nas células do septo, sustenta a absorção ativa de sal em ambiente dulcícola (parte superior da Fig. 1). Além disso, os modelos de secreção de sal encontrado em teleósteos, que parece ser recorrente em invertebrados e vertebrados de modo geral, também incluem a NKA como um componente importante nos mecanismos de secreção de sal (parte inferior da Fig. 2). A  $H^+$ -ATPase imunolocalizada nas células pilares e a anidrase carbônica distribuída por todo tecido branquial também corroboraram os modelos hipotéticos na absorção de sal em água doce (Kirschner 2004; Freire *et al.* 2008a; McNamara e Faria 2012).

A modulação da atividade e da expressão, gênica e proteica, de transportadores envolvidos no transporte iônico vetorial nas brânquias, como a NKA,  $H^+$ -ATPase e anidrase carbônica, pode representar uma resposta dos organismos frente à transferência para meios com salinidades distintas. Além disso, a capacidade de invasão e permanência em novos ambientes, associado ao grau de eurihalinidade, é dependente da capacidade dos organismos em lidar com as possíveis alterações na concentração iônica do fluido extracelular diante do choque osmótico (Péqueux 1995; Lucu e Towle 2003; Kirschner 2004; Freire *et al.* 2008a; McNamara e Faria 2012). Porém, outras alterações no epitélio, que não a modulação dessas proteínas investigadas, podem estar envolvidas na tolerância de *M. acanthurus* frente à salinidade 25‰, como por exemplo, na espécie *M. olfersii* evidentes modificações estruturais do epitélio branquial são induzidas pela aclimação ao meio salino (Freire e McNamara 1995; McNamara e Lima 1997).

A alteração da atividade e expressão da NKA em resposta a alteração de salinidade vem sendo registrada em palemonídeos, apresentando redução da sua atividade e expressão quando as espécies são submetidas ao aumento de salinidade em diferentes tempos de exposição. A atividade da NKA branquial na espécie diádroma *M. amazonicum* transferida diretamente da salinidade 0‰ para 25‰ sofreu redução em 1h e 5h após exposição, apresentando aumento da atividade enzimática a valores próximos ao controle após 24 horas e posterior diminuição após 5 e 10 dias. Para essa espécie a expressão de RNAm da NKA foi hiper-regulada atingindo pico em 1 h de exposição, após esse período os valores foram reestabelecidos (Faleiros *et al.* 2010). Uma diminuição de 2.5 vezes foi encontrada na abundância relativa de NKA em resposta à aclimação por 10 dias em salinidade 21‰ na fração microssomal de *M. amazonicum* quando comparado ao controle em água doce (Belli *et al.* 2009). A atividade enzimática medida na espécie de *M. olfersii* foi diminuída em animais expostos a salinidade 21‰ e 28‰ durante 20 dias quando comparado ao grupo controle em água doce (Lima *et al.* 1997). Isto sugere que a diminuição na atividade e expressão da NKA, durante aclimação a longo prazo, pode estar associada às respostas dos organismos a transferência entre salinidades e a diferentes tempos de exposição. Em relação a inalteração da atividade ATPásica total, na espécie *M. olfersii* também foi encontrada ausência de alteração nos animais aclimatados durante 21‰ e 28‰ durante 20 dias (Lima *et al.* 1997). Esses dados sugerem que a aclimação à salinidade elevada pode não alterar a atividade total das ATPases, no entanto não se descarta alterações na composição do conjunto de transportadores iônicos do epitélio branquial em períodos mais prolongados de exposição ao aumento de salinidade, podendo esse efeito ser observado em *M. acanthurus* após maior período em salinidade 25‰.

Uma segunda hipótese para a secreção de sal em ambientes salobros seria o possível envolvimento do cotransportador NKCC frente ao aumento de salinidade, assim como proposto pelos modelos hipotéticos estabelecidos no epitélio secretor de palemonídeos (parte inferior Fig. 1; McNamara e Faria 2012), embora não avaliado nesse estudo. Apesar de não encontrado nenhum dado envolvendo NKCC1 em palemonídeos, foi encontrado aumento de 60 vezes na expressão de RNAm do NKCC branquial no caranguejo estuarino *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata* aclimatado à salinidade elevada (45‰) (Luquet *et al.* 2005). Ainda, não há resposta transcricional do NKCC branquial no caranguejo *Carcinus maenas* em resposta à salinidade diluída (Towle *et al.* 2011), o que sugere participação na secreção de sal em braquiúros.

A  $H^+$ -ATPase integra o grupo de transportadores responsáveis pela absorção de sal em água doce e poucos são os registros de trabalhos que caracterizam sua participação nos epitélios de troca frente ao choque osmótico em camarões palemonídeos. A atividade da  $H^+$ -ATPase é 10 vezes maior em espécies de ambiente dulcícola, como o camarão *M. olfersi*, do que espécies que ocupam águas salobras, como *M. amazonicum* (Furriel *et al.* 2000). Em *M. amazonicum* há um transiente aumento na expressão de RNAm da  $H^+$ -ATPase branquial em 1 h de exposição a salinidade 25‰, com redução dos valores para próximos aos encontrados na situação controle em água doce após 5 horas e posterior manutenção de valores reduzidos até 10 dias (Faleiros *et al.* 2010). Em pós-larvas do camarão eurihalino *Litopenaeus vannamei* exposto à salinidade 22‰ para 31‰ a atividade da  $H^+$ -ATPase permaneceu inalterada (Pan *et al.* 2007). No caranguejo *Dilocarcinus pagei* a atividade da  $H^+$ -ATPase branquial foi reduzida drasticamente na primeira hora de exposição a salinidade 21‰, se mantendo em níveis reduzidos por até 10 dias (Firmino *et al.* 2010). No entanto, no caranguejo marinho *Carcinus maenas* não houve alteração na expressão de RNAm da  $H^+$ -ATPase quando exposto a diluição da salinidade (10-15‰) em todo período de 15 dias (Towle *et al.* 2011). Esses resultados apresentados pela literatura indicam que a participação da  $H^+$ -ATPase parece estar mais envolvida no mecanismo de absorção de sal em ambiente diluído e talvez períodos mais prolongados de exposição à salinidade 25‰ poderiam alterar a atividade e distribuição da  $H^+$ -ATPase nas brânquias de *M. acanthurus*.

A enzima anidrase carbônica está envolvida nas adaptações a baixas salinidades por crustáceos eurihalinos, embora não foram encontrados trabalhos com palemonídeos. Na espécie de caranguejo marinho *Carcinus maenas* o aumento transiente da expressão de RNAm para anidrase carbônica é seguido pela síntese de novas proteínas por um período prolongado (Henry *et al.* 2002; Henry *et al.* 2003). Isso sugere que a alteração da atividade enzimática depende da modulação dos mecanismos de regulação transcricional da enzima, ou seja, uma maior atividade requer aumento da expressão e abundância das proteínas disponíveis (Henry 2006). Não foram encontradas alterações na abundância relativa e atividade da enzima em *M. acanthurus* exposto ao aumento de salinidade, e talvez para anidrase carbônica os mecanismos de regulação sejam mais significativos na transferência à diluição de salinidade e não o contrário (Jillette *et al.* 2011).

As alterações na osmolalidade e na hidratação tecidual de *Macrobrachium acanthurus* exposto por 24h à salinidade 25‰ (dados não publicados) não foi suficiente para causar modificações na atividade, expressão e localização das proteínas branquiais NKA,  $H^+$ -



ATPase e anidrase carbônica. No entanto, alterações na expressão de RNAm dessas proteínas (não avaliadas nesse estudo) não podem ser descartadas. A tolerância dessa espécie ao choque hiper-osmótico pode também estar relacionada à ativação de outros mecanismos compensatórios, como alterações na permeabilidade do epitélio, na abundância relativa do conjunto de proteínas osmorregulatórias ou na participação de outras proteínas importantes na secreção de sal.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, A.O.; Coelho, P.A.; Luz, J.R.; Santos, J.T.A.; Ferraz, N.R. 2008. Decapod crustaceans in fresh waters of southeastern Bahia, Brazil. *Rev Biol Trop* 56(3): 1225-1254.
- Augusto, A.; Pinheiro, A.S.; Greene, L.J.; Laure, H.J.; McNamara, J.C. 2009. Evolutionary transition of freshwater by ancestral marine palaemonids: evidence from osmoregulation of in a tide pool shrimp. *Aquat Biol* 7: 113-122.
- Belli, N.M.; Faleiros, R.O.; Firmino, K.C.S.; Masui, D.C.; Leone, F.A.; McNamara, J.C.; Furriel, R.P.M. 2009. Na,K-ATPase activity and epithelial interfaces in gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp Biochem Physiol* 152A: 431-439.
- Boudour-Bouchecker, N.; Boulo, V.; Lorin-Nebel, C. Elguero, C.; Grousset, E.; Anger, K.; Charmantier- Daures, M.; Charmantier, G. 2013. Adaptation to freshwater in the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*: comparative ontogeny of osmoregulatory organs. *Cell Tissue Res* 353: 87-98.
- Choudhury, P.C. 1970. Complete larval development of the Palaemonidae shrimp *Macrobrachium acanthurus* (WIEGMANN, 1836) reared in the laboratory – *Crustaceana* 18(2): 113 – 132.
- Duarte, R.M.; Ferreira, M.S.; Wood, C.M.; Val, A.L. 2013. Effect of low pH exposure on Na<sup>+</sup> regulation in two cichlid fish species of the Amazon. *Comp Biochem Physiol* 166A: 441-448.
- Evans, D.H.; Piermarini, P.M.; Choe, K.P. 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol Rev* 85:97-177.
- Faleiros, R.O.; Goldman, M.H.; Furriel, R.P.; McNamara, J.C. 2010. Differential adjustment in gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- and V-ATPase activities and transporter mRNA expression during osmoregulatory acclimation in the cinnamon shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *J Exp Biol* 213: 3894–3905.
- Firmino, K.C.; Faleiros, R.O.; Masui, D.C.; McNamara, J.C.; Furriel, R.P. 2011. Short- and long-term, salinity-induced modulation of V-ATPase activity in the posterior gills of the

- true freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae). *Comp Biochem Physiol* 160B: 24–31
- França, J.L.; Pinto, M.R.; Lucena, M.N; Garçon, D.P; Valenti, W.C.; McNamara J.C.; Leone, F.A. 2013. Subcellular Localization and Kinetic Characterization of a Gill ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-ATPase from the Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *J Membrane Biol* 246: 529-543.
- Freire, C.A.; McNamara, J.C. 1995. Fine structure of the gills of the fresh-water shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda): effect of acclimation to high salinity medium and evidence for involvement of the intralamellar septum in ion uptake. *J Crustac Biol* 15: 103-116.
- Freire, C.A.; Cavassin, F.; Rodrigues, E.N.; Torres, A.H.; McNamara, J.C. 2003. Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. *Comp Biochem Physiol* 136A: 771-778.
- Freire, C.A; Onken, H.; McNamara, J.C. 2008 (a). A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comp Biochem Physiol* 151A: 272–304.
- Freire, C.A.; Amado, E.M.; Souza, L.R.; Veiga, M.P.T.; Vitule, J.R.S.; Souza, M.M.; Prodocimo, V. 2008 (b). Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comp Biochem Physiol* 149: 435-446.
- Furriel, R.P.M.; McNamara, J.C.; Leone, F.A. 2000. Characterization of ( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ )-ATPase in gill microsomes from the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 126: 303-315.
- Gonzalez, R.J. 2012. The physiology of hyper-salinity tolerance in teleost fish: a review. *J Comp Physiol* 182B: 321-329.
- Henry, R.P. 2001. Environmentally mediated carbonic anhydrase induction in the gills of euryhaline crustaceans. *J Exp Biol* 204: 991-1002.
- Henry, R.P.; Gehnrich, S.; Weihrauch, D.; Towle, D.W. 2003. Salinity-mediated carbonic anhydrase induction in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*. *Comp Biochem Physiol* 136A: 243-258.
- Henry, R.P. 2006. Functional evidence for the presence of a carbonic anhydrase repressor in the eyestalk of the euryhaline green crab *Carcinus maenas*. *J Exp Biol* 209: 2595-2605.
- Jillette, N.; Cammack, L.; Lowenstein, M.; Henry, R.P. 2011. Down-regulation of activity and expression of three transport-related proteins in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*, in response to high salinity acclimation. *Comp Biochem Physiol* 158A: 189-193.
- Kirschner, L.B. 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J Exp Biol* 207: 1439–1452.

- Kütz, D.; Somero, G.N. 1995. Osmotic and thermal effects on *in situ* ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys Mirabilis*. J Exp Biol 198: 1883-1894.
- Lara, A.F. 2003. Curso temporal da regulação osmo-iônica no camarão de água doce eurihalino *Macrobrachium acanthurus* (Palaemonidae) quando submetido a meio hiperoσμótico – Trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná – UFPR. CURITIBA.
- Lima, A.G.; McNamara, J.C.; Terra, W.B. 1997. Regulation of hemolymph osmolytes and gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activities during acclimation to saline media in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). J Exp Mar Biol Ecol 215: 81-91.
- Lucu, C.; Towle, D.W. 2003.  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase in gills of aquatic crustacea. Comp Biochem hysiol A Physiol 135: 195-214.
- Luquet ,C.M.; Weihrauch, D.; Senek, M.; Towle, D.W. 2005. Induction of branchial ion transporter mRNA expression during acclimation to salinity change in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*. J Exp Biol 208: 3627–3636.
- Marshall, W.S.; Grosell, M. 2005. Ion transport, osmoregulation and acid-base balance. In Physiology of Fishes. Vol. 3 (ed. D. Evans and J. B. Claiborne), pp. 177-230. Boca Raton: CRC Press.
- Martinez, C.B.R.; Harris, R.R.; Santos, M.C.F. 1998. Transepithelial potential differences and sodium fluxes in isolated perfused gills of the mangrove crab *Ucides cordatus*. Comp Biochem Physiol 120A: 227–237.
- McNamara, J.C. Lima, A.G. 1997. The route of Ion and Water Movements Across the Gill Epithelium of the Freshwater Shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae): Evidence From Ultrastructural Changes Induced by Acclimation to Saline Media. Biol bull 192: 321-331.
- McNamara, J.C.; Faria, S.C. 2012. Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. J Comp Physiol 182B: 997-1014.
- Moreira, G.S.; McNamara, J.C.; Shumway, S.E.; Moreira, P.S. 1983. Osmoregulation and respiratory metabolism in Brazilian *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). Comp Biochem Physiol 74A: 57–62.
- Murphy, N.P.; Austin, C.M. 2005. Phylogenetic relationships of the globally distributed freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae): biogeography, taxonomy and the convergent evolution of abbreviated larval development. Zool Scripta 34: 187-197.
- New, M. B. 1995. Status of freshwater farming a review. Aquacult res 26: 1-54.
- Pan, L.Q.; Zhang, L.J.; Liu, H.Y. 2007. Effects of salinity and pH on ion-transport enzyme activities, survival and growth of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. Aquaculture 273: 711–720.
- Péqueux, A. 1995. Osmotic regulation in crustaceans. J Crustac Biol 5: 1–60.

- Putzenlechner, M.; Onken, H.; Klein, U.; Graszynski, K. 1992. Electrogenic Cl<sup>-</sup> uptake across the gill epithelium of *Eriocheir sinensis*: energized by a Vtype ATPase? *Verh Dtsch Zool Ges* 85, 160.
- Quadros, M.L.A.; Maciel, C.; Bastos, S.; Sampaio, I. 2004. Reprodução do camarão canela – *Macrobrachium acanthurus* em condições controladas de laboratório e montagem de um atlas para identificação de estágios larvais. *Revista Científica da UFPA* <http://www.ufpa.br/revistaic> Vol 4.
- Serrano, L.; Halanych, K.M.; Henry, R.P. 2007. Salinity-stimulated changes in expression and activity of two carbonic anhydrase isoforms in the blue crab *Callinectes sapidus*. *J Exp Biol* 210: 2320-2332.
- Serrano, L.; Henry, R.P. 2008. Differential expression and induction of two carbonic anhydrase isoforms in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity. *Comp Biochem Physiol* 3D: 186-193.
- Towle, D.W.; Henry, R.P.; Terwilliger, N.B. 2011. Microarray-detected changes in gene expression in gills of green crabs (*Carcinus maenas*) upon dilution of environmental salinity. *Comp Biochem Physiol* 6D: 115-125.

## CONCLUSÕES GERAIS

Os modelos de transporte iônico nas brânquias compilados a partir de dados de tolerância ao sal e diversificação dos mecanismos osmorregulatórios encontrados em diferentes espécies, podem auxiliar no entendimento dos processos de invasão e ocupação de nichos osmoticamente distintos. A espécie *R. quelen* apresentou aumento apenas da expressão da NKA e anidrase carbônica branquial, garantindo o equilíbrio osmo-iônico plasmático frente à salinidade intermediária (15‰). O aumento da NKA é devido a sua importância na geração de gradientes eletroquímicos para transporte de sal, tanto na absorção quanto na secreção, e o aumento da enzima intracelular anidrase carbônica é devido ao seu envolvimento com a regulação do equilíbrio ácido-base, além do seu papel osmorregulatório. A ausência de alterações na espécie extremamente eurihalina *C. parallelus*, quando exposta à água doce por 10 dias, sugere a participação de outros mecanismos que favorecem a absorção de sal e permitem a sobrevivência da espécie em água doce, o que não descarta a possibilidade de ocorrerem alterações transientes na atividade e na expressão gênica e proteica desses transportadores em períodos de exposição mais curtos. A ausência de alterações na atividade e abundância da NKA, H<sup>+</sup>-ATPase e anidrase carbônica nas brânquias de *M. acanthurus* frente à salinidade de 25‰ por 24 horas, também sugere a participação de outros mecanismos ou transportadores envolvidos na resposta ao choque hiper-osmótico. As três espécies exibem diferentes graus de tolerância à variação de salinidade. Apesar de diferenças nas condições e tempo experimentais e divergências entre o passado evolutivo dos grupos a qual pertencem, ambos *R. quelen*, *C. parallelus* e *M. acanthurus* são capazes de tolerar salinidades intermediárias (inclusive *C. parallelus* tolera salinidades que vão da água do mar à água doce), sem prejuízos osmorregulatórios, o que possibilita a utilização de regiões estuarinas como ponte para dispersão e ocupação de novos habitats pelas espécies.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackerman, P.A.; Forsyth, R.B.; Mazur, C.F.; Iwama, G.K. 2000. Stress hormones and the cellular stress response in salmonids. *Fish Physiol Biochem* 23:327-336.
- Basu, N.; Todgham, A.E.; Ackerman, P.A.; Bibeau, M.R.; Nakano, K.; Schulte, P.M.; Iwama, G.K. 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene* 295:173-183.
- Begon, M.; Townsend, C.R.; Harper, J.L. 2007. *Ecologia de Indivíduos a Ecossistemas*. 4ªed, Artmed, Porto Alegre.
- Belli, N.M.; Faleiros, R.O.; Firmino, K.C.S.; Masui, D.C.; Leone, F.A.; McNamara, J.C.; Furriel, R.P.M. 2009. Na,K-ATPase activity and epithelial interfaces in gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp Biochem Physiol* 152A: 431-439.
- Boudour-Boucheker, N.; Boulo, V.; Lorin-Nebel, C.; Elguero, C.; Grousset, E.; Anger, K.; Charmantier-Daures, M.; Charmantier, G. 2013. Adaptation to freshwater in the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*: comparative ontogeny of osmoregulatory organs. *Cell Tissue Res* 353: 87-98.
- Chasiotis, H.; Kolosov, D.; Bui, P.; Kelly, S.P. 2012. Tight junctions, tight junction proteins and paracellular permeability across the gill epithelium of fishes: A review. *Resp Physiol Neurobiol* 184: 269-281.
- Claiborne, J.B.; Edwards, S.L.; Morrison-Shetlar, A.I. 2002. Acid–base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *J Exp Zool* 293: 302–319.
- Colson-Proch, C.; Morales, A.; Hervant, F.; Konecny, L.; Moulin, C.; Douady, C.J. 2010. First cellular approach of the effects of global warming on groundwater organisms: a study of the HSP70 gene expression. *Cell Stress Chaperon* 15: 259-270.
- Deane, E.E.; Kelly, S.P.; Luk, J.C.Y.; Woo, N.Y.S. 2002. Chronic Salinity Adaptation Modulates Hepatic Heat Shock Protein and Insulin-like Growth Factor I Expression in Black Sea Bream. *Mar Biotechnol* 4: 193-205.
- Delaney, M.A.; Klesius, P.H. 2004. Hypoxic conditions induce Hsp70 production in blood, brain and head kidney of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 236: 633-644.
- Duarte, R.M.; Ferreira, M.S.; Wood, C.M.; Val, A.L. 2013. Effect of low pH exposure on Na<sup>+</sup> regulation in two cichlid fish species of the Amazon. *Comp Biochem Physiol* 166A: 441-448.
- Evans, D.H.; Piermarini, P.M.; Choe, K.P. 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol Rev* 85: 97-177.
- Evans, D.H. 2011. Freshwater Fish Gill Ion Transport: August Krogh to morpholinos and microprobes. *Acta Physiol* 202: 349-359.

- Faleiros, R.O.; Goldman, M.H.; Furriel, R.P.; McNamara, J.C. 2010. Differential adjustment in gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - and V-ATPase activities and transporter mRNA expression during osmoregulatory acclimation in the cinnamon shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). J Exp Biol 213: 3894–3905.
- Feder, M.E.; Hofmann, G.E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. Annu Rev Physiol 61: 243-282.
- Florkin, M. 1962. La régulation isosmotique intracellulaire chez les invertébrés marins euryhalins. Bull Acad Roy Belg Cl Sci 48: 687–694.
- Forgac, M. 1999. Structure and properties of the vacuolar ( $\text{H}^+$ )-ATPases. J Biol Chem 274: 12951-12954.
- Foster, C.; Amado, E.M.; Souza, M.M.; Freire, C.A. 2010. Do osmoregulators have lower capacity of muscle water regulation than osmoconformers? A study on decapod crustaceans. J Exp Zool 313A: 80–94.
- França, J.L.; Pinto, M.R.; Lucena, M.N.; Garçon, D.P.; Valenti, W.C.; McNamara J.C.; Leone, F.A. 2013. Subcellular Localization and Kinetic Characterization of a Gill ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-ATPase from the Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. J Membrane Biol 246: 529-543.
- Freire, C.A.; McNamara, J.C.; Rosa, J.C.; Greene, L.J. 1995. Neuroendocrine control of osmotic regulation in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda): free amino acid concentration in the hemolymph. Gen Comp Endocrinol 100: 83–91.
- Freire, C.A.; Onken, H.; McNamara, J.C. 2008 (a). A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. Comp Biochem Physiol 151A: 272–304.
- Freire, C.A.; Amado, E.M.; Souza, L.R.; Veiga, M.P.T.; Vitule, J.R.S.; Souza, M.M.; Prodocimo, V. 2008 (b). Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. Comp Biochem Physiol 149: 435-446.
- Freire, C.A.; Souza-Bastos, L.R.; Amado, E.M.; Prodocimo, V.; Souza, M.M. 2013. Regulation of muscle hydration upon hypo-or hyper-osmotic shocks: Differences related to invasion of the freshwater habitat by Decapod Crustaceans. J Exp Zool 319A: 297-309.
- Gilmour, K.M.; Perry, S.F. 2009. Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish. J Exp Biol. 212: 1647-1661.
- Gutierre, S.M.M.; Vitule, J.R.S.; Freire, C.A.; Prodocimo, V. 2013. Physiological tools to predict invasiveness and spread via estuarine bridges: tolerance of Brazilian native and worldwide introduced freshwater fishes to increased salinity. Mar Freshwater Res 64: 1-12.
- Haas, M.; Forbush, B. 2000. The Na-K-Cl Cotransporter of secretory epithelia. Ann Rev Physiol 62: 515-34.

- Havird, J.C.; Henry, R.P.; Wilson, A.E. 2013. Altered expression of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and other osmoregulatory genes in the gills of euryhaline animals in response to salinity transfer: A meta-analysis of 59 quantitative PCR studies over 10 years. *Comp Biochem Physiol* 8D: 131-140.
- Henry, R.P.; Swenson, E.R. 2000. The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate gas exchange organs. *Resp Physiol* 121: 1–12.
- Hiroi, J.; McCormick, S.D. 2007. Variation in salinity tolerance, gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  cotransporter and mitochondria-rich cell distribution in three salmonids *Salvelinus namaycush*, *Salvelinus fontinalis* and *Salmo salar*. *J Exp Biol* 210: 1015–1024.
- Hirose, S.; Kaneko, T.; Naito, N.; Takei, Y. 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comp Biochem Physiol* 136B: 593-620.
- Hofmann, G.E. 2005. Patterns of Hsp gene expression in ectothermic marine organisms on small to large biogeographic scales. *Integrative Comp Biol* 45: 247-255.
- Hoffmann, E.K.; Schettino, T.; Marshall, W.S. 2007. The role of volume-sensitive ion transport systems in regulation of epithelial transport. *Comp Biochem Physiol* 148A: 29-43.
- Huang, C.Y.; Chao, P.L.; Lin, H.C. 2010.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and vacuolar-type  $\text{H}^+$ -ATPase in the gills of the aquatic air-breathing fish *Trichogaster microlepis* in response to salinity variation. *Comp Biochem Physiol* 155A: 309-318.
- Hwang, P.P.; Lee, T.H. 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comp Biochem Physiol* 148A: 479–497.
- Iwama, G.K.; Afonso, L.O.B.; Todgham, A.; Ackerman, P.; Nakano, K. 2004. Are hsp suitable for indicating stressed states in fish? *J Exp Biol* 207: 15-19.
- Jonsson, H.; Schiedek, D.; Goksoyr, A. 2006. Expression of cytoskeletal proteins, cross-reacting with anti-CYP1A, in *Mytilus* sp. exposed to organic contaminants. *Aquat Toxicol* 78S: S42–S48.
- Kirschner, L.B. 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J Exp Biol* 207: 1439–1452.
- Lima, A.G.; McNamara, J.C.; Terra, W.B. 1997. Regulation of hemolymph osmolytes and gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activities during acclimation to saline media in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). *J Exp Mar Biol Ecol* 215: 81-91.
- Lionetto, M.G.; Caricato, R.; Giordano, M.E.; Erroi, E.; Schettino, T. 2012. Carbonic Anhydrase as Pollution Biomarker: An Ancient Enzyme with a New Use. *Int J Env* 9: 3965-3977.
- Lucu, C.; Towle, D.W. 2003.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 135: 195-214.



- Marshall, W.S.; Grosell, M. 2005. Ion transport, osmoregulation and acid-base balance. In *Physiology of Fishes*. Vol. 3 (ed. D. Evans and J. B. Claiborne), pp. 177-230. Boca Raton: CRC Press.
- Mayer, M.P.; Bukau, B. 2005. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62: 670-684.
- McNamara, J.C.; Faria, S.C. 2012. Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. *J Comp Physiol* 182B: 997-1014.
- Niu, C.J.; Rummer, J.L.; Brauner, C.J.; Schulte, P.M. 2008. Heat shock protein (Hsp70) induced by a mild heat shock slightly moderates plasma osmolarity increases upon salinity transfer in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol* 148C: 437-444.
- Péqueux, A. 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *J Crustac Biol* 5: 1-60.
- Perry, S.F.; Matthew, L.B.; Johnson, D.A. 2000. Cloning and molecular characterization of the trout (*Oncorhynchus mykiss*) vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase B subunit. *J Exp Biol* 203: 459-470.
- Perry, S.F.; Shahsavarani, A.; Georgalis, T.; Bayaa, M.; Furimsky, M.; Thomas, S.L.Y. 2003. Channels, pumps, and exchangers in the gill and kidney of freshwater fishes: their role in ionic and acid-base regulation. *J Exp Zool* 300A: 53-62.
- Perry, S.F.; Gilmour, K.M. 2006. Acid-base balance and CO<sub>2</sub> excretion in fish: unanswered questions and emerging models. *Resp Physiol Neurobiol* 154: 199-215.
- Prodocimo, V.; Freire, C.A. 2006. The Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> cotransporter of estuarine pufferfishes (*Sphoeroides testudineus* and *S. greeleyi*) in hypo- and hyper-regulation of plasma osmolality. *Comp Biochem Physiol* 143C: 347-355.
- Rhee, J.S.; Raisuddin, S.; Lee, K.W.; Seo, J.S.; Ki, J.S.; Kim, I.C.; Park, H.G.; Lee, J.S. 2008. Heat shock protein (Hsp) gene responses of the intertidal copepod *Tigriopus japonicas* to environmental toxicants. *Comp Biochem Physiol* 149C: 104-112.
- Russell, M.J. 2000. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev* 80: 211-276.
- Sáez, A.G.; Lozano, E.; Zaldívar-Riverón, A. 2009. Evolutionary history of Na,K-ATPases and their osmoregulatory role. *Genetica* 136: 479-490.
- Santos, L.C.F.; Belli N.M.; Augusto, A.; Masui, D.C.; Leone, F.A.; McNamara, J.C.; Furriel, R.P.M. 2007. Gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in diadromous, freshwater palaemonid shrimps: Species-specific kinetic characteristics and  $\alpha$ -subunit expression. *Comp Biochem Physiol* 148A: 178-188.
- Sattin, G.; Mager, E.M.; Beltrami, M.; Grosell, M. 2010. Cytosolic carbonic anhydrase in the Gulf toadfish is important for tolerance to hypersalinity. *Comp Biochem Physiol* 156A: 169-175.
- Sen, D.; Fang, W.; Hao, S.; Biao, G.; Shuanglin, D. 2008. Effects of Salinity Fluctuation Frequency on the Osmolarity, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase Activity and HSP70 Expression in Juvenile Chinese Shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *J Ocean Univ China* 8: 71-76.

- Souza-Bastos, L.; Freire, C.A. 2009. The handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 289: 167–174.
- Timofeev, M.A.; Shatilina, Zh.M.; Bedulina, D.S.; Protopopova, M.V.; Kolesnichenko, A.V. 2006. Application of Heat Shock Proteins as Stress Markers in Aquatic Organisms using Endemic Baikal Amphipods as an Example. *Appl Biochem Micro* 44: 310-313.
- Tomanek, L. 2008. The importance of physiological limits in determining biogeographical range shifts due to global climate change: the heat shock response. *Physiol Biochem Zool* 81: 709–717.
- Webb, D.; Gagnon, M.M. 2008. The Value of Stress Protein 70 as an Environmental Biomarker of Fish Health Under Field Conditions. *Environ Toxicol* 24: 287-295.
- Willmer, P.; Stone, G. and Johnston, I. 2005. *Environmental physiology of animals*. Second edition. Blackwell Science, Oxford, U.K. 754 p.
- Yamashita, M.; Yabu, T.; Ojima, N. 2010. Stress Protein HSP70 in Fish. *Aqua-BioScience Monographs* 3: 111-141.
- Yang, W.K.; Kang, C.K.; Chen, T.Y.; Chang, W.B.; Lee, T.H. 2011. Salinity-dependent expression of the branchial  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  cotransporter and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in the sailfin molly correlates with hypoosmoregulatory endurance. *J Comp Physiol* 181 B: 953–964.